

**UNTERSUCHUNGEN ZUR SEGREGATION,
TRANSMISSION UND REKOMBINATION
EXTRACHROMOSOMAL VERERBT
ANTIBIOTICA – RESISTENZMARKER BEI DER
SPALTHEFE
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE L.**

Gertrud Seitz

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555618_0015

Aus dem Genetischen Institut der Universität München

Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. F. Kaudewitz

UNTERSUCHUNGEN ZUR SEGREGATION, TRANSMISSION
UND REKOMBINATION EXTRACHROMOSOMAL VERERBTER
ANTIBIOTICA - RESISTENZMARKER BEI DER SPALTHEFE,
SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE L.



INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie
der Ludwig - Maximilians - Universität München

vorgelegt von

Gertrud Seitz

aus Asperg

München 1977



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Cleve

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 11. 1977

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von
1974 bis 1977 am Genetischen Institut der
Universität München unter Anleitung von
Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz für
die Bereitstellung eines Laborplatzes mit guten
Arbeitsmöglichkeiten, für seine grosszügige
Förderung und sein Interesse für diese Arbeit.
Herrn Dr. K. Wolf bin ich für seine zahlreichen
Ratschläge und wertvollen Diskussionen dankbar.
Ich danke Herrn Dr. R. J. Schweyen für die Hilfe
bei der Einarbeitung und anregende Diskussionen.
Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für ihre
Hilfsbereitschaft.
Der Universität München danke ich für die finanzielle
Unterstützung durch Gewährung eines
Graduierten - Stipendiums.

Bedürfnis nach Klarheit

Der erste Schritt des Geistes besteht darin, zwischen Wahrem und Falschem zu unterscheiden. Dennoch ist die erste Entdeckung des Denkens, das über sich selbst reflektiert, ein Widerspruch. Es wäre eine unnötige Mühe, hier noch Überzeugendes zu sagen. Seit Jahrhunderten gibt es hierüber keine klarere und elegantere Darlegung als die des Aristoteles:

"Die oft belachte Konsequenz dieser Ansichten ist die, dass sie sich selbst zerstören. Denn mit der Behauptung, dass alles wahr sei, behaupten wir auch die Wahrheit der entgegengesetzten Behauptung und damit die Falschheit unserer eigenen These (denn die entgegengesetzte Behauptung kann dann nicht wahr sein). Wenn man aber sagt, alles sei falsch, dann ist auch diese Behauptung falsch. Wenn man erklärt, einzig die unserer Aussage entgegengesetzte Behauptung sei falsch oder allein unsere Behauptung sei nicht falsch, dann müssen wir nichtsdestoweniger eine Unzahl wahrer und falscher Urteile zulassen. Denn wer eine wahre Behauptung ausspricht, behauptet, dass sie wahr sei, und so fort bis ins Unendliche."

Albert Camus: Der Mythos von Sisyphos
Ein Versuch über das Absurde

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG.....	1
II. MATERIAL und METHODEN.....	5
1. Nomenklatur und Abkürzungen	5
2. Stämme.....	6
3. Medien und Chemikalien	8
4. Methoden	9
III. ERGEBNISSE	10
1. Extrachromosomale Vererbung der Erythromycin- und Chloramphenicol - Resistenz	10
1.1. Isolierung der Mutanten.....	10
1.2. Bestimmung der Vermehrungsrate	10
1.3. Nachweise für den extrachromosomalen Charakter des Erbganges.....	11
1.3.1. Mitotische Segregation der Diploiden.....	11
1.3.2. Tetradenanalysen	14
1.3.3. Mitotische Haploidisierung.....	20
1.4. Mutator - Effekt der Mutante ana^r - 8.....	23
1.5. Segregation der Resistenzmarker	
1.5.1. in diploide Zellen nach Zygotenbildung	26
1.5.2. mit Nachbebrütung	35
1.5.3. in haploide Zellen nach Sporenbildung	37
1.5.4. mit Zwischenbebrütung der Diploiden	51
1.5.5. Zusammenfassung	54

1.6. Nachweis von Rekombinationsvorgängen	
1.6.1. im meiotischen System	56
1.6.2. im mitotischen System	57
1.6.3. Bestimmung der Häufigkeit doppelresistenter Rekombinanten	63
1.7. Transmission der Resistenzmarker	
1.7.1. in haploide Zellen nach Sporenbildung	64
1.7.2. in diploide Zellen nach Zygotenbildung	65
1.8. Prüfung des Einflusses des Chloramphenicol-Resistenzmarkers auf die Wachstumsgeschwindigkeit doppelresistenter Stämme ..	69
2. Chromosomale Vererbung der Erythromycin - Resistenz	70
2.1. Bestimmung der Vermehrungsrate	70
2.2. Fehlen der mitotischen Segregation	70
2.3. Tetradenanalysen	71
2.4. Freisporanalysen	71
2.5. Mitotische Haploidisierung	73
IV. DISKUSSION	74
1. Segregation	74
1.1. Geschwindigkeit der Segregation	74
1.2. Segregationsmuster in individuellen Zygoten - Klonen	76
2. Transmission	77
3. Rekombination	78
V. ZUSAMMENFASSUNG	82
VI. LITERATURVERZEICHNIS	84

I. EINLEITUNG

Bulder (1964) teilte die Hefen auf Grund der Fähigkeit eines Stammes nach Behandlung mit Acriflavin atmungsdefekte Mutanten zu bilden ein. Einige Hefen, z. B. *Saccharomyces cerevisiae* (*Sacch. cerevisiae*) bilden 50 % - 100 % atmungsdefekte Mutanten und werden als "petite - positiv" bezeichnet. Von *Schizosaccharomyces pombe* (*Schiz. pombe*) und einigen anderen Hefespecies wurden nur wenige atmungsdefekte Mutanten erhalten, von einer Gruppe von Hefen konnten überhaupt keine isoliert werden: sie erhielten die Bezeichnung "petite - negativ". Da alle atmungsdefekten Mutanten der Spaltheefe *Schiz. pombe* chromosomale Vererbung zeigten, wurde von Heslot et al. (1970) der Begriff "Petite - Negativität" so definiert, dass Hefen, in denen keine extrachromosomal vererbten atmungsdefekten Mutanten entstehen können, als petite - negative Hefen bezeichnet werden.

Die Ursache für Petite - Positivität und Petite - Negativität scheint in Unterschieden der mitochondrialen DNS (mtDNS) zu liegen. Von *Sacch. cerevisiae* ist bekannt, dass Ethidiumbromid drastische Veränderungen der mtDNS verursacht (Perlman und Mahler, 1971; Mahler und Bastos, 1974). Bandlow und Kaudewitz (1974) konnten für *Schiz. pombe* zeigen, dass selbst eine Behandlung mit hohen Konzentrationen von Ethidiumbromid weder zum Verlust noch zur Verringerung der mtDNS - Moleküle führt. In der Literatur wird beschrieben, dass petite - negative Hefen im allgemeinen eine kürzere mtDNS als petite - positive Hefen besitzen (O'Connor, 1975). Deshalb könnte man vermuten, dass die Länge der DNS für die Petite - Negativität eine Rolle spielt. Da z. B. *Torulopsis glabrata* eine ähnlich kurze mtDNS wie *Schiz. pombe* besitzt, aber trotzdem petite - positiv ist, wurde von Clark-Walker und Miklos (1974) angenommen, dass bestimmte Strukturen der

mtDNS, wie z. B. AT - reiche Sequenzen bei *Sacch. cerevisiae* für die Exzision und damit die Bildung defekter Genome (ρ^-) nötig sein könnten. Dagegen spricht, dass einige petite - negative Hefen ebenfalls AT - reiche mtDNS haben. Besonderheiten der Struktur reichen als Erklärung für das Phänomen der Petite - Negativität nicht aus. Es ist möglich, dass lebensnotwendige Informationen in der mtDNS petite - negativer Hefen kodiert sind (Borst et al., 1969), deren Verlust zu Lebensunfähigkeit führt.

Von *Sacch. cerevisiae* ist bekannt, dass das Molekulargewicht der mtDNS 50×10^6 Daltons beträgt und die Länge somit etwa 25 μ (Hollenberg et al., 1970). Für die mtDNS von *Schiz. pombe* ist ein Molekulargewicht von $12,5 \times 10^6$ Daltons und somit eine Länge von 6 μ beschrieben worden (O'Connor et al., 1975). In einer neueren Arbeit von Tabak und Weijers (1976) wird durch genauere Untersuchungen ein Molekulargewicht von 17×10^6 Daltons bestimmt, was einer Länge von etwa 8,5 μ entspricht. Unter der Annahme, dass für alle Organismen die Mindestgenomlänge der mtDNS etwa 5 μ beträgt, könnten längere DNS - Moleküle beispielsweise durch Vielfachung des Genoms (O'Connor et al., 1976) oder durch zusätzliche Sequenzen entstanden sein. Als Besonderheit sind bei der Bäckerhefe AT - reiche Sequenzen (82 %) gefunden worden, die als Spacer interpretiert werden (Prunell und Bernardi, 1974). Diese Regionen sind vielleicht, wie schon oben erwähnt, für die Besonderheiten der ρ^- - Bildung (Clark - Walker und Miklos, 1974) und mitochondrialer Rekombination (Dujon et al., 1974; 1975) verantwortlich. Bei *Schiz. pombe* findet man mit Hilfe von Dichtebestimmungen einen AT - Gehalt von etwa 67 % und eine mtDNS - Länge, die wenig über der Mindestgenomlänge liegt. Bei *Sacch. cerevisiae* weiss man nicht, inwieweit die Phänomene der Segregation, Transmission und Rekombination durch die spezielle Struktur der mtDNS oder durch den besonderen Vermehrungsmechanismus der Knospung zu erklären sind. Immer nur ein Teil des Cytoplasmas der Zygote

wandert in die Knospe ein, wobei ein Auswahlmechanismus unbekannter Art (Aufderheide und Johnson, 1976) und die Lage der Knospe eine Rolle spielen (Callen, 1974). Bei Schiz. pombe dagegen liegen ähnliche Verhältnisse wie in Zellen höherer Organismen vor. Das Gesamtplasma einer Zygote wird auf 2 Tochterzellen gleicher Grösse verteilt. Die Spalthefe besitzt somit Modellcharakter auf Grund der Länge und des GC - Gehaltes ihrer mtDNS und des Teilungsmechanismus der Zellen. Zusätzlich ist für dieses Objekt die chromosomale Genetik gut ausgearbeitet (Gutz et al., 1974).

Die antimycin - resistente Mutante ana^r -8 war die erste Mutante von Schiz. pombe, für die extrachromosomale Vererbung nachgewiesen werden konnte (Wolf et al., 1976 a). Sie hat die Fähigkeit, spontan extrachromosomal vererbte atmungsdefekte Mutanten zu bilden (Wolf et al., 1976 b). Da diese Eigenschaft nur in der Mutante ana^r -8, nicht aber im Wildtyp zu finden ist, lag es nahe, zu prüfen, ob ausgehend von ana^r -8 auch spontane extrachromosomal vererbte Resistenzmutanten erhalten werden können. Als zu selektierende Mutantentypen wurden Erythromycin- und Chloramphenicol - Resistenz gewählt, da mittels dieser Marker bei Sacch. cerevisiae die Grundlagen der mitochondrialen Genetik erarbeitet worden waren (Thomas und Wilkie, 1968; Coen et al., 1970). Durch diese Resistenzmarker ana^r , cap^r , ery^r würde die Möglichkeit gegeben, Vorgänge der extrachromosomalen Vererbung bei Schiz. pombe und Sacch. cerevisiae vergleichend zu untersuchen. Dass dabei grundlegende Unterschiede zu Sacch. cerevisiae erkennbar werden können, ist durch den unterschiedlichen Zellteilungsmodus und durch das kurze, GC - reiche mitochondriale Genom von Schiz. pombe zu erwarten. Ziel der vorliegenden Arbeit war es somit, spontane chloramphenicol- und erythromycin - resistente Mutanten von der Mutante ana^r -8 zu isolieren und ihren Erbgang durch mitotische Segregation, Tetradenanalysen und mitotische Haploidisierung zu

bestimmen. Im Falle extrachromosomaler Mutanten sollte mit Hilfe dieser Marker Transmission, Segregation und Rekombination sowohl im mitotischen als auch im meiotischen System untersucht und mit den bekannten Befunden von *Sacch. cerevisiae* verglichen werden.

II. MATERIAL und METHODEN

1. Nomenklatur

extrachromosomal vererbte
Resistenz/ Sensibilität:

$\text{ery}^{\text{r}}/\text{ery}^{\text{s}}$ = Erythromycin - Resistenz/Sensibilität

$\text{cap}^{\text{r}}/\text{cap}^{\text{s}}$ = Chloramphenicol - Resistenz/Sensibilität

$\text{ana}^{\text{r}}/\text{ana}^{\text{s}}$ = Antimycin - Resistenz/Sensibilität

in
Tabellen:

$\text{E}^{\text{R}}/\text{E}^{\text{S}}$

$\text{C}^{\text{R}}/\text{C}^{\text{S}}$

$\text{A}^{\text{R}}/\text{A}^{\text{S}}$

kernkodierte Resistenz:

$\text{ery}^{\text{r}}\text{-n}$ (n = nucleus)

ade 7 = Auxotrophie für die Aminosäure Adenin im Locus 7

ADE 7 = Prototrophie

Abkürzungen

R = resistant

S = sensibel

EB = Ethidiumbromid

JG = Janusgrün

AA = Antimycin A

CAP = Chloramphenicol

ERY = Erythromycin

RD = atmungsdefizient (respiratory - deficient)

RC = atmungskompetent (respiratory - competent)

DNS = Desoxyribonucleinsäure

mtDNS = mitochondriale DNS

Sacch. cerevisiae = Saccharomyces cerevisiae

Schiz. pombe = Schizosaccharomyces pombe

P1, P2 = Parentaltyp 1 bzw. 2

R1, R2 = Rekombinante 1 bzw. 2

2. Stämme

Die Nummern nach den Resistenzmarkern sind keine Locusbezeichnungen, sondern Isolationsnummern. Es geht also nicht daraus hervor, ob es sich um identische oder unterschiedliche Mutationsorte handelt.

Kerngenotyp	mitochondrialer Genotyp	Kurzbez.	Herkunft
wt-975 h ⁺			U. Leupold, Bern
wt-972 h ⁻			
ural-171 h ⁺			
leu1-32 h ⁺			
arg1-230 h ⁺			
lys4-95 h ⁻			
ade7-50 h ⁻			
mei3-71 ade6-216 h ⁺			R. Egel, Freiburg (1973)
mei3-71 ade6-210 h ⁻			
mei1-102 ural-171 arg1-1			J. Kohli, Bern (1976)
mei1-102 ural-171 his3-237			
ade7-50 h ⁻	ana ^r -8	A ^R	G. Burger (1976)
ade7-50 h ⁻	ana ^r -8 ery ^r -16	A ^R E ^R	
"	"	"	spontane Mutanten von ana ^r -8
"	"	"	"
"	"	"	"
"	"	"	"

ade7-50 h ⁻	ana ^r -8 cap ^r -1	A ^R _C ^R	spontane Mutante von ana ^r -8
"	" -2	"	"
ade7-50 h ⁻	ana ^r -8 cap ^r -9 ery ^r -16	A ^R _C ^R _E	spontane Mutante von ana ^r -8 ery ^r -16
ade7-50 h ⁺	ery ^r -16-15D	E ^R	aus: ade7-50 h ⁻ ana ^r -8 ery ^r -16 x ural1-171 h ⁺
meil-102 ural1-171	ery ^r -16-12B	F ^R	aus: meil-102 ural-171 arg1-1 x ^r ade7-50 h ⁺ ana ^r -8 ery ^r -16
ural1-171 h ⁺	ery ^r -16-7A	E ^R	aus: ade7-50 h ⁻ ana ^r -8 ery ^r -16 x ural1-171 h ⁺
" h ⁻	ery ^r -16-14B	E ^R	" " x " "
" "	ana ^r -8 ery ^r -16-15C	A ^R _E ^R	" " x " "
ade7-50 h ⁺	cap ^r -1-23A	C ^R	aus: ade7-50 h ⁻ ana ^r -8 cap ^r -1 x ural1-171 h ⁺
meil-102 ade7-50	cap ^r -1-2C	C ^R	aus: meil-102 ural1-171 arg1-1 x ^r ade7-50 h ⁺ cap ^r -1-23A
meil-102 arg1-1	cap ^r -1-3C	C ^R	" " x " "
ade7-50 h ⁺	ana ^r -8	A ^R	aus: ade7-50 h ⁻ ana ^r -8 x ural1-171 h ⁺
ural1-171 h ⁻	ana ^r -8	A ^R	aus: ade7-50 h ⁻ ana ^r -8 x ural1-50 h ⁺ ery ^r -16-7A
ural1-171 h ⁺	ana ^r -8	A ^R	aus: " " x " "
ade7-50 h ⁻	cap ^r -1 ery ^r -16	C ^R _E ^R	aus: ade7-50 h ⁺ cap ^r -1-23A x ^r ural1-171 h ⁻ ery ^r -16-14B
mei3-71 ade6-210 h ⁻ ery ^r -38			spontane Mutanten von
" -42			mei3-71 ade6-210 h ⁻ (Wolf)
" -62			
" -63			

3. Medien

Hefeextrakt - Glucose - Medium (Leupold, 1955)

Hefeextrakt - Glycerin Medium (Wolf et al. 1971)

Malzextrakt - Medium (Leupold, 1955)

Synthetisches Minimalmedium (Leupold, 1955)

Semisynthetisches Minimalmedium (Johnson, 1967)

Semisynthetisches Sporulationsmedium (Munz und Leupold, 1970)

Medium zum Haploidisieren (Kohli, 1976)

Phosphatpuffer 0,5 m; pH 6,2 (Mattenheimer, 1966)

Antibiotica - Konzentrationen:

Antimycin 1 mg/l

Chloramphenicol 2 g/l

Erythromycin 4 g/l

Die Antibiotica werden in absolutem Alkohol gelöst und dem auf etwa 40°C abgekühlten Glycerin - Hefeextrakt - Medium zugegeben. Die Antibiotica - Medien sind 0,05 m an Puffer pH 6,2.

Phloxin B (Magdalarot) - Färbung:

20 mg/l werden zu dem auf 40°C abgekühlten Medium in sterilem Wasser gelöst zugegeben.

Medium für Dauerkulturen:

Glycerin 500 ml

Glucose 10 g

Pepton 10 g

Hefeextrakt 10 g

H₂O bidest. ad 1000 ml

Die stationäre Kultur in flüssigem Hefeextrakt - Glucose - Medium wird abzentrifugiert, 0,1 ml des Sediments in das Medium gegeben und bei -20°C aufbewahrt.

Chemikalien:

Soweit nicht anders angegeben von Firma Merck, Darmstadt.

Chloramphenicol: Bayer, Leverkusen

Erythromycin: Boehringer, Mannheim

Antimycin: Nutrial Biochemical Corporation

Phloxin B: Sigma, Chemical Company, St. Louis USA

3 (m-Fluorophenyl) - DL - alanin: Fluka AG, Schweiz

Helicase: Boehringer, Mannheim

Ethidiumbromid: Serva GmbH, Heidelberg

Janusgrün: Chroma, Stuttgart

4. Methoden

Freisporanalyse, Tetradenanalyse, Mitotische Segregation,

Haploidisierung (Wolf et al., 1976 a)

Prüfung auf den Paarungstyp (Leupold, 1970)

III. ERGEBNISSE

1. Extrachromosomale Vererbung der Erythromycin- und Chloramphenicol - Resistenz

1.1. Isolierung der Mutanten

Eine stationäre Kultur der Antimycin-resistenten Mutante $\text{ana}^{\text{r}}-8$ wurde auf Erythromycin - Medium (4 mg/ml) plattiert. Nach 4 - 6 Wochen Inkubation bei 30°C entstand 1 spontane Mutante bezogen auf 4×10^4 ursprünglich plattierte Zellen. Plattierung der Mutante $\text{ana}^{\text{r}}-8$ auf Chloramphenicol - Medium (2 mg/ml) ergab 1 Mutante bezogen auf 7×10^4 Zellen.

1.2. Bestimmung der Vermehrungsrate

Aus den Ergebnissen der photometrischen Messungen (Klett Photometer) wurden Wachstumskurven des Parentaltyps $\text{ana}^{\text{r}}-8$ und der Mutanten $\text{ana}^{\text{r}}-8 \text{ cap}^{\text{r}}-1$ und $\text{ana}^{\text{r}}-8 \text{ ery}^{\text{r}}-16$ gezeichnet. Die in Tabelle 1 aufgeführten Werte für die Generationsdauer in verschiedenen Medien wurden an Hand einer Eichkurve (Wolf, 1973) ermittelt. Die Generationsdauer ist die Zeit, die zur Verdopplung des Zelltiters benötigt wird. Die Absterberate liegt dabei unter 0,2 % und wurde deshalb nicht berücksichtigt, da die Messfehler ein mehrfaches dieses Wertes betragen.

Die Generationsdauer der beiden Mutanten ist in Glucose - Medium wesentlich geringer als in Glycerin - Medium. Im Glucose - Medium mit Antibioticum erreichen die Zellen die stationäre Phase bei geringerem Titer.

Medium	ana ^r -8	ana ^r -8 cap ^r -1	ana ^r -8 ery ^r -16
Glucose	2,5	2,5	2,5
Glycerin	8,5	11,0	8,5
Glucose + CAP	3,0	2,5	---
Glucose + ERY	3,0	---	2,5
Glycerin + CAP	kein Wachstum	16,0	kein Wachstum
Glycerin +CAP + AA	"	16,0	"
Glycerin + ERY	"	kein Wachstum	10,0
Glycerin + ERY + AA	"	"	12,0

Tab. 1: Generationsdauer des Parentaltyps ana^r-8 und der Mutanten ana^r-8 cap^r-1 und ana^r-8 ery^r-16 in Stunden.

1.3. Nachweise extrachromosomaler Vererbung

1.3.1. Mitotische Segregation der Diploiden

Mitotische Segregation ist bei *Sacch. cerevisiae* ein Kriterium extrachromosomaler Vererbung (Bolotin et al., 1971). Da bei *Schiz. pombe* die diploide Phase auf die Zygote beschränkt ist, wurde die Untersuchung der Diploiden erst durch Einführung von sporulationsdefekten Mutanten möglich (Egel, 1973). Die Mutation meil blockiert die erste meiotische Teilung, so dass die Segregation extrachromosomaler Marker in stabilen Diploiden beobachtet werden kann.

Alle 200 isolierte Erythromycin - resistente und alle 89 Chloramphenicol - resistente Mutanten zeigen mitotische Segregation der Diploiden. Einige Mutanten wurden genauer untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2 - 4 zusammengefasst.

Es gibt Ausstriche, die auf Antibioticum - Medium Kolonien bilden, solche bei denen keine Koloniebildung zu beobachten ist und solche bei denen nur einige Papillen heranwachsen. Das papillenartige Wachstum zeigt, dass die Zellen dieser diploiden Zygoten - Kolonie verschiedene Genotypen haben. Um zu bestimmen, inwieweit Zygoten - Kolonien mit sensiblen oder resistentem Phänotyp ausschliesslich aus sensiblen bzw. resistenten Zellen bestehen, wurden Zygoten - Kolonien resuspendiert, verdünnt, ausplattiert und auf die entsprechenden Antibiotica - Medien gestempelt. Ergebnisse dieser Analysen sind im Abschnitt 1.5.1. aufgeführt.

Für alle folgenden Tabellen gilt:

- Reihenfolge der Resistenzmarker stets A - C - E
- P1 bzw. P2 = Parentaltyp 1 bzw. 2, in den ersten 2 Spalten
- R1 bzw. R2 = Rekombinante 1 bzw. 2, in 3. und 4. Spalte.

Kreuzung: $ade7-50\ h^- ana^r-8\ ery^r$ (P1) $\times$ $meil\ ural-171\ arg1-1$ (P2)

ery^r Mutante	P1 $A_{R_E}R$	P2 $A_{S_E}S$	R1 $A_{R_E}S$	R2 $A_{S_E}R$	Anzahl unters. Kolonien
ery^r-16	51,6	38,4	2,1	7,9	797
ery^r-31	48,8	33,4	2,9	14,9	281
ery^r-41	51,1	40,8	1,1	7,0	174
ery^r-42	33,9	55,3	2,4	8,4	369

Tab. 2: Mitotische Segregation des Antimycinmarkers ana^r-8 und der Erythromycin - Resistenzmarker $ery^r-16, -31, -41, -42$ in diploide Zellen nach Zygotenbildung. Zahlen in %.

Kreuzung: $ade7^{-}50 h^{-}ana^r-8 cap^r$ (P1) $\times$ $meil\ ural-171\ arg1-1$ (P2)

cap - Mutante	P1 $A^R_C R$	P2 $A^S_C S$	R1 $A^R_C S$	R2 $A^S_C R$	Anzahl unters. Kolonien
cap^r-1	16,4	55,8	10,7	17,1	1693
cap^r-2	26,9	48,9	6,2	18,0	480

Tab. 3: Mitotische Segregation des Antimycin - Resistenzmarkers ana^r-8 und der Chloramphenicol - Resistenzmarker cap^r-1 und cap^r-2 in diploide Zellen nach Zygotenbildung. Zahlen in %.

Kreuzung: $ade7^{-}50 h^{-}ana^r-8$ (P1) $\times$ $meil\ ural-171\ ery^r$ (P2)

ery^r Mutante	P1 $A^R_E S$	P2 $A^S_E R$	R1 $A^R_E R$	R2 $A^S_E S$	Anzahl unters. Kolonien
$ery^r-16-12B$	17,1	23,1	57,6	2,0	547
$ery^r-16-10A$	19,1	27,8	51,1	2,0	299
$ery^r-16-9B$	15,3	24,1	56,2	4,4	294

Tab. 4: Mitotische Segregation des Antimycin - Resistenzmarkers ana^r-8 und der Erythromycin - Resistenzmarker $ery^r-16-12B$, $-10A$ und $9B$ in diploide Zellen nach Zygotenbildung nach Kreuzung in trans - Konfiguration. Zahlen in %.

1.3.2. Tetradenanalysen

Alle Tetraden zeigen die für chromosomale Kodierung charakteristische regelmässige 2 : 2 Segregation der auxotrophen Marker Adenin und Uracil und des Paarungstyps. Bezüglich der Chloramphenicol - und Erythromycin - Resistenz zeigen die Tetraden alle möglichen Verteilungsmuster, wie in Tabelle 5 von Kreuzungen in cis - Konfiguration und in Tabelle 6 von Kreuzungen in trans - Konfiguration dargestellt ist. In Tabelle 7 sind die Parental- und Rekombinantentypen von Tetradenanalysen der Kreuzungen in trans - Konfiguration aufgeführt. Die Auswertung macht insofern Schwierigkeiten, als sich in den Stempelabdrücken mancher Sporen auf Antibiotica - Medien papillenartige Koloniebildung zeigt, einige Sporen also nicht reinerbig sind. Die häufig stattgefundene aberrante Segregation der Resistenzmarker in die haploiden Sporen ist ein wichtiges Kriterium für extrachromosomale Vererbung. Um die Sporen - Kolonien, die bezüglich ihrer Resistenzmarker noch nicht reinerbig sind, genauer zu untersuchen, wurden sie resuspendiert, ausplattiert und auf Antibiotica - Medien gestempelt. Die Ergebnisse sind im Kapitel 1.5.3. aufgeführt.

Tab. 5: Aufspaltung der Resistenzmarker $\text{ana}^{\text{r-8}}$, $\text{ery}^{\text{r-16}}$, $\text{cap}^{\text{r-1}}$ in Tetraden von Kreuzungen in cis - Konfiguration. Die Zahlen geben die Anzahl vollständiger Tetraden an.

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^- \text{ana}^{\text{r-8}} \text{ery}^{\text{r}}$ (P1) x ura1-171 h^+ (P2)

$\text{E}^{\text{S}} : \text{E}^{\text{R}}$	$\text{ery}^{\text{r-16}}$	$\text{ery}^{\text{r-31}}$	$\text{ery}^{\text{r-41}}$	$\text{A}^{\text{S}} : \text{A}^{\text{R}}$	$\text{ery}^{\text{r-16}}$	$\text{ery}^{\text{r-31}}$	$\text{ery}^{\text{r-41}}$
4 : 0	3	0	2	4 : 0	3	1	4
3 : 1	10	6	7	3 : 1	16	4	7
2 : 2	23	5	7	2 : 2	19	6	6
1 : 3	2	1	0	1 : 3	0	1	0
0 : 4	0	0	1	0 : 4	0	0	0
Summe	38	12	17	Summe	38	12	17

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^- \text{ana}^{\text{r-8}} \text{cap}^{\text{r-1}}$ (P1) x ura1-171 h^+ (P2)

$\text{C}^{\text{S}} : \text{C}^{\text{R}}$	Anzahl Tetraden	$\text{A}^{\text{S}} : \text{A}^{\text{R}}$	Anzahl Tetraden
4 : 0	0	4 : 0	0
3 : 1	5	3 : 1	4
2 : 2	18	2 : 2	22
1 : 3	5	1 : 3	2
0 : 4	0	0 : 4	0
Summe	28	Summe	28

Tab. 6: Aufspaltung der Resistenzmarker $\text{ana}^{\text{r}}-8$, $\text{ery}^{\text{r}}-16-7\text{A}$, $\text{ery}^{\text{r}}-16-14\text{B}$, $\text{cap}^{\text{r}}-1$ und $\text{cap}^{\text{r}}-1-23\text{A}$ in Tetraden von Kreuzungen in trans - Konfiguration.

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^- \text{ana}^{\text{r}}-8$ (P1) $\times$ $\text{ural-171 h}^+ \text{ery}^{\text{r}}-16-7\text{A}$ (P2)

$\text{A}^{\text{S}} : \text{A}^{\text{R}}$	Anzahl Tetraden	$\text{E}^{\text{S}} : \text{E}^{\text{R}}$	Anzahl Tetraden
4 : 0	2	4 : 0	0
3 : 1	11	3 : 1	4
2 : 2	46	2 : 2	39
1 : 3	1	1 : 3	15
0 : 4	0	0 : 4	2
Summe	60	Summe	60

Kreuzung: $\text{ural-171 h}^- \text{ana}^{\text{r}}-8$ (P1) $\times$ $\text{ade7-50 h}^+ \text{cap}^{\text{r}}-1-23\text{A}$ (P2)

$\text{A}^{\text{S}} : \text{A}^{\text{R}}$	Anzahl Tetraden	$\text{C}^{\text{S}} : \text{C}^{\text{R}}$	Anzahl Tetraden
4 : 0	1	4 : 0	3
3 : 1	1	3 : 1	8
2 : 2	41	2 : 2	33
1 : 3	2	1 : 3	2
0 : 4	2	0 : 4	1
Summe	47	Summe	47

Fortsetzung der Tabelle 6:

Kreuzung: $ura1-171 h^{-}ery^R-16-14B$ (P1) x $ade7-50 h^{+}cap^R-1-23A$ (P2)

$E^S : E^R$	Anzahl Tetraden	$C^S : C^R$	Anzahl Tetraden
4 : 0	0	4 : 0	2
3 : 1	2	3 : 1	18
2 : 2	51	2 : 2	33
1 : 3	0	1 : 3	0
0 : 4	0	0 : 4	0
Summe	53	Summe	53

Kreuzung: $ade7-50 h^{-}ana^R-8 cap^R-1$ (P1) x $ura1-171 h^{+}ery^R-16-7A$ (P2)

$A^S : A^R$	Tetraden	$C^S : C^R$	Tetraden	$E^S : E^R$	Tetraden
4 : 0	5	4 : 0	5	4 : 0	2
3 : 1	23	3 : 1	22	3 : 1	5
2 : 2	20	2 : 2	21	2 : 2	22
1 : 3	0	1 : 3	0	1 : 3	19
0 : 4	0	0 : 4	0	0 : 4	0
Summe	48	48		48	

Tab. 7: Häufigkeit der Parental- und Rekombinantentypen
nach Tetradenanalysen von Kreuzungen in trans -
Konfiguration.

Kreuzung: $ade7-50\ h^{-}ana^{r}-8$ (P1) x $ura1-171\ h^{+}ery^{r}-16-7A$ (P2)

	P1 $A^{R}E^{S}$	P2 $A^{S}E^{R}$	R1 $A^{R}E^{R}$	R2 $A^{S}E^{S}$	Summe
%	34,2	48,7	9,6	7,5	100
Anzahl Sporen	82	117	23	18	240 (=60 Tetr.)

Kreuzung: $ura1-171\ h^{-}ana^{r}-8$ (P1) x $ade7-50\ h^{+}cap^{r}-1-23A$ (P2)

	P1 $A^{R}C^{S}$	P2 $A^{S}C^{R}$	R1 $A^{R}C^{R}$	R2 $A^{S}C^{S}$	Summe
%	50,5	45,7	1,6	2,2	100
Anzahl Sporen	95	86	3	4	188 (=47 Tetr.)

Kreuzung: $ura1-171\ h^{-}ery^{r}-16-14B$ (P1) x $ade7-50\ h^{+}cap^{r}-1-23A$ (P2)

	P1 $E^{R}C^{S}$	P2 $E^{S}C^{R}$	R1 $E^{R}C^{R}$	R2 $E^{S}C^{S}$	Summe
%	50,0	42,0	0	8,0	100
Anzahl Sporen	106	89	0	17	212 (=53 Tetr.)

Tetradenanalysen nach Zwischenbebrütung der Diploiden

Ein weiterer Hinweis, dass unvollständige Plasmadurchmischung stattgefunden hat, zeigt der folgende Versuch: Nach der Kreuzung auf synthetischem Sporulationsagar wurden die Diploiden in synthetischem Minimalmedium mit 5 % Glucose und 0,35 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zwischenbebrütet. Die Stickstoffverbindungen im Medium verhindern sofortige Sporulation (Egel, 1971). Zur Sporulation wurden 0,2 ml der Suspension auf Malzagar - Schrägröhrchen gebracht. Die Ergebnisse der Tetradenanalyse zeigt Tabelle 8. Die sonst sehr häufige 2R : 2S Segregation tritt nicht auf, dagegen viel häufiger die Konfigurationen 0R : 4S und 4R : 0S. Eine 2R : 2S Aufspaltung ist von der Morphologie her einleuchtend, wenn man sich vorstellt, dass sich die Sporen gleich nach der Zygotenentstehung bilden. Nach Zwischenbebrütung der Diploiden hat sich das Cytoplasma vermutlich besser durchmischt und Mitochondrien und mitochondriale DNS sind besser verteilt. Eine Zwischenbebrütung in Hefeextrakt - Medium mit 7 % Glucose bringt allerdings keine signifikante Abnahme der 2R : 2S Tetraden, wie aus Kapitel 1.5.4. zu ersehen ist. Die spezifische Wirkung des Minimal - Mediums kann nicht erklärt werden.

Tab. 8: Aufspaltung der Resistenzmarker in Tetraden nach Zwischenbebrütung der Diploiden in Minimal - Medium.

Kreuzung: $\text{ade}^7\text{-50 h}^-\text{ana}^{\text{r}}\text{-8 ery}^{\text{r}}\text{-16} \times \text{ura1-171 h}^+$

Anzahl der Tetraden	Tetradentyp	Phänotyp der Sporen
8	4 : 0	$\text{A}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$
3	4 : 0	$\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$
1	4 : 0	$\text{A}^{\text{S}}\text{E}^{\text{R}}$
1	3 : 1	$\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}, \text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{S}}$

1.3.3. Mitotische Haploidisierung

Nach umfangreichen Kartierungsversuchen mit Hilfe mitotischer Haploidisierung (Da Cunha, 1970), konnten alle über 100 bekannten Mutationsorte nur auf 3 Chromosomen lokalisiert werden (Kohli, 1976; Kohli et al., 1977). Die Methode basiert darauf, dass Marker auf dem gleichen Chromosom stets zusammen-segregieren, mit Ausnahme seltener mitotischer Rekombinations-ereignisse. Bei Kreuzungen benützt man für jedes der 3 bekannten Chromosomen eine Aminosäure - Auxotrophie als Marker. Die Tabellen 9 und 11 zeigen, dass die Erythromycin- und Chloramphenicol - Resistenzmarker ery^R -16 bzw. cap^R -1 mit keinem der drei Marker gekoppelt sind. Dadurch wird die Lokalisierung auf einem der 3 Chromosomen ausgeschlossen. Da die Existenz weiterer Chromosomen möglich ist, wurde zur Prüfung auf den extrachromosomalen Erbgang folgende Versuchsanordnung gewählt.

Durch die Vermehrung von heteroplasmatischen Diploiden ("resistente" und "sensible" Mitochondrien sind enthalten) auf selektivem Medium kommt es zur Anreicherung von resistenten Diploiden. Dies kann durch eine sukzessive Herausverdünnung von "sensiblen" Mitochondrien geschehen. Haploidisierung dieser Diploider ergibt überwiegend resistente Haploide (Tab. 9 und 11). Haploidisierung sensibler Diploider ergibt vorwiegend sensible Haploide (Tab. 10 und 12). Rezessive oder dominante Resistenzmarker würden zu etwa gleichen Teilen in resistente und sensible Haploide segregieren, gleichgültig ob die Ausgangsdiploide vom selektiven oder nicht - selektiven Medium isoliert wurde.

Tab. 9: Anzahl haploider Kolonien nach Haploidisierung
resistenter Diploider, die von selektivem Medium
isoliert wurden.

Kreuzung: ade7-50 h⁻ana^r-8ery^r-16 x meil-102 ura1-171 arg1-1

	E ^R	E ^S
Chromosom I URA 1	1338	7
ura 1	96	2
Chromosom II ADE 7	1331	2
ade 7	103	7
Chromosom III ARG 1	1267	3
arg 1	167	6

Tab. 10: Anzahl haploider Kolonien nach Haploidisierung
sensibler Diploider, die von Glucose - Medium
isoliert wurden.

Kreuzung: ade7-50 h⁻ana^r-8 ery^r-16 x meil-102 ura1-171 arg1-1

	E ^R	E ^S
Chromosom I URA 1	0	202
ura 1	0	371
Chromosom II ADE 7	0	515
ade 7	0	58
Chromosom III ARG 1	0	489
arg 1	0	84

Tab. 11: Anzahl hapoider Kolonien nach Haploidisierung
resistenter Diploider, die von selektivem Medium
isoliert wurden.

Kreuzung: $ade7-50 h^{-} ana^{r}-8 cap^{r}-1 \times meil-102 ura1-171 arg1-1$

		C^R	C^S
Chromosom I	URA 1	2638	20
	ura 1	146	26
Chromosom II	ADE 7	637	20
	ade 7	2147	26
Chromosom III	ARG 1	522	20
	arg 1	2262	26

Tab. 12: Anzahl hapoider Kolonien nach Haploidisierung
sensibler Diploider, die von Glucose - Medium
isoliert wurden.

Kreuzung: $ade7-50 h^{-} ana^{r}-8 cap^{r}-1 \times meil-102 ura1-171 ard1-1$

		C^R	C^S
Chromosom I	URA 1	1	132
	ura 1	0	476
Chromosom II	ADE 7	0	493
	ade 7	1	115
Chromosom III	ARG 1	0	341
	arg 1	1	267

1.4. Mutator - Effekt der Mutante $\text{ana}^{\text{r}}-8$

Stationäre Kulturen der Mutante $\text{ana}^{\text{r}}-8$ in Glucose - Hefe-extrakt - Medium enthalten etwa 1 % atmungsdefekte Mutanten (Wolf et al., 1976 b). Die grosse Häufigkeit des Entstehens sowohl spontaner atmungsdefekter als auch antibiotica - resistenter Mutanten (1 unter 10^4) lassen auf eine Eigenschaft der Mutante $\text{ana}^{\text{r}}-8$ schliessen, die als Mutator - Effekt bezeichnet werden kann. Die Tatsache, dass alle 200 Erythromycin- und alle 89 Chloramphenicol - resistenten von der $\text{ana}^{\text{r}}-8$ abgeleiteten Mutanten extrachromosomalen Erbgang aufweisen, zeigt, dass der "Mutator" der $\text{ana}^{\text{r}}-8$ spezifisch auf die mitochondriale DNS wirkt. Alle 20 vom Wildtyp abgeleitete spontane Mutanten (4 davon in dieser Arbeit beschrieben) erwiesen sich als chromosomal vererbt. Es stellte sich die Frage, ob Antimycin - Resistenz und Mutator - Effekt pleiotrope Wirkungen des gleichen Mutationsortes sind oder, ob es sich um verschiedene Mutationsorte handelt. Um dies zu prüfen, wurden Doppelmутanten der Genotypen $\text{ana}^{\text{r}}-8\text{cap}^{\text{r}}-1$ bzw. $\text{ana}^{\text{r}}-8\text{ery}^{\text{r}}-16$ mit einem sensiblen Stamm gekreuzt und Antimycin - sensible Sporen isoliert. Zur Bestimmung der Mutatoreigenschaft eines Sporenisolates wurde die Befähigung zur Bildung spontaner, Ethidiumbromid- und Janusgrün-induzierter atmungsdefekter Mutanten geprüft. Die Untersuchung von 4 Antimycin - sensiblen Sporenisolaten zeigte, dass die Mutatoreigenschaft zusammen mit dem Antimycinmarker verloren gegangen war (Tab. 13). Eine umfangreichere Analyse von Sporenisolaten ergab jedoch, dass auch Antimycin - sensible Isolate den Mutatoreffekt zeigen und dass nicht alle Antimycin - resistenten Isolate Mutatorwirkung erkennen lassen (Tab. 14). Die für die Ausbildung der Antimycin - Resistenz verantwortliche Nucleotidsequenz der mtDNS ist somit durch Rekombination von derjenigen trennbar, welche den Mutator - Effekt bedingt.

Tab. 13: Bildung atmungsdefekter Mutanten spontan, mit Ethidiumbromid (10 µg/ml) und Janusgrün (7,5 µg/ml) nach etwa 4 Generationen. Zahlen in %.

Stamm	K o n t r o l l e			Ethidiumbromid			Janusgrün		
	RC	RD	Kolonien	RC	RD	Kolonien	RC	RD	Kolonien
ana ^r -8	97,5	2,5	480	93,2	6,8	219	87,0	13,0	393
ana ^r -8 ery ^r -16	97,1	2,9	238	91,2	8,8	397	90,5	9,5	486
ana ^r -8 cap ^r -1	97,9	2,1	283	95,5	4,5	334	97,7	2,3	485
ana ^r -8 cap ^r -9 ery ^r -16	95,2	4,8	351	92,3	7,7	248	91,7	8,3	375
ery ^r -16-14B	100	0	218	100	0	342	100	0	195
ery ^r -16-7A	100	0	279	100	0	720	100	0	235
cap ^r -1-23A	100	0	404	100	0	708	100	0	433
cap ^r -1 ery ^r -16	100	0	325	100	0	274	100	0	378

Tab. 14: Bildung atmungsdefekter Mutanten von Sporenisolaten zweier Kreuzungen nach Behandlung mit Ethidiumbromid (10 µg/ml). Die Anzahl der geprüften Sporenisolate ist angegeben. Es wurden pro Sporenisolat 200 Kolonien untersucht.

RD = dieser Stamm bildet atmungsdefekte Mutanten

RC = dieser Stamm bildet keine atmungsdefekten Mutanten.

Kreuzung: $ade7-50 h^{-} ana^{r-8}$ (P1) x $ura1-171 h^{+} ery^{r-16-7A}$ (P2)

	P1 $A^R E^S$	P2 $A^S E^R$	R1 $A^R E^R$	R2 $A^S E^S$
RD	6	2	4	8
RC	5	10	6	14

Kreuzung: $ura1-171 h^{+} ana^{r-8}$ (P1) x $ade7-50 h^{-} cap^{r-1-23A}$ (P2)

	P1 $A^R C^S$	P2 $A^S C^R$	R1 $A^R C^R$	R2 $A^S C^S$
RD	2	2	9	0
RC	8	9	1	11

1.5. Segregation der Resistenzmarker

1.5.1. in diploide Zellen nach Zygotenbildung

Um das Segregationsverhalten in sich mitotisch teilenden Diploiden zu untersuchen, wurden einzelne Zygoten - Kolonien analysiert. Diese stammten aus Kreuzungen, bei denen jeweils ein Kreuzungspartner zusätzlich den Sporulationsdefekt der Mutante meil-102 trägt. Die an der Magdalarot - Färbung erkenntlichen diploiden Zygoten - Kolonien (dunkelrot) wurden isoliert, suspendiert, erneut auf Minimalmedium mit Magdalarot plattiert und auf Selektivmedien gestempelt. Die Tabellen 16, 17, 18 zeigen die Ergebnisse von Kreuzungen in trans - Konfiguration, die Tabellen 19, 20, 21, 22 von Kreuzungen in cis - Konfiguration. Tabelle 15 verdeutlicht die theoretisch möglichen Klassen (I - XV), in welche die Zygoten - Kolonien eingeteilt werden können. Alle folgenden Tabellen richten sich in der Nomenklatur nach dieser Klassifizierung und halten die gleiche Reihenfolge ein. Nicht alle theoretisch möglichen Typen konnten gefunden werden. Es kann nicht entschieden werden, ob die Klassen II, V, VI, XIII und XIV nicht vorkommen oder so selten, dass sie bei der vorliegenden Stichprobengrösse nicht gefunden wurden.

Die wesentlichsten Beobachtungen dieser Versuche sind:

- Es kommen Zygoten - Kolonien vor, welche beide Parental- und beide Rekombinantentypen enthalten, sowie Zygoten - Kolonien, denen 1 oder beide Parental- bzw. Rekombinantentypen fehlen.
- Die zahlenmässige Aufteilung von Parental- und Rekombinantentypen in Zygoten - Kolonien einer Klasse zeigt starke Streuung.
- Besonders häufig sind Zygoten - Kolonien des doppelsensiblen Typs, der als Parental- und als Rekombinantentyp auftritt.
- Zygoten - Kolonien des doppelresistenten Phänotyps, sei es als Parental- oder Rekombinantentyp, kommen nicht homoplasmatisch vor.

Tab. 15: Mögliche Phänotypen der Diploiden in Zygoten - Kolonien.

Klasse	P1	P2	R1	R2	Terminologie	
I	+	+	+	+	biparental	birekombinant
II	+	+	+	-	"	unirekombinant 1
III	+	+	-	+	"	unirekombinant 2
IV	+	+	-	-	"	nullirekombinant
V	+	-	+	+	uniparental 1	birekombinant
VI	+	-	+	-	"	unirekombinant 1
VII	+	-	-	+	"	unirekombinant 2
VIII	+	-	-	-	"	nullirekombinant
IX	-	+	+	+	uniparental 2	birekombinant
X	-	+	+	-	"	unirekombinant 1
XI	-	+	-	+	"	unirekombinant 2
XII	-	+	-	-	"	nullirekombinant
XIII	-	-	+	+	nulliparental	birekombinant
XIV	-	-	+	-	"	unirekombinant 1
XV	-	-	-	+	"	unirekombinant 2

Tab. 16: Segregation des Antimycinmarkers $\text{ana}^{\text{r}}-8$ und des Erythromycinmarkers $\text{ery}^{\text{r}}-16-9\text{B}$ in diploide Zellen nach Zygotenbildung. Zahlen in %.

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^- \text{ana}^{\text{r}}-8$ (P1) x $\text{meil-102 his3-237 ery}^{\text{r}}-16-9\text{B}$ (P2)

Zygote Nr.	P1 $\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{S}}$	P2 $\text{A}^{\text{S}}\text{E}^{\text{R}}$	R1 $\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$	R2 $\text{A}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$	Anzahl unters. Kolonien	Klasse
1	13,4	36,3	7,6	42,7	157	I
2	3,8	93,2	0,4	2,6	266	
3	10,4	65,1	14,5	10,0	269	
4	0,9	77,6	0,9	20,7	116	
5	33,8	43,9	0	22,3	157	III
6	25,9	40,3	0	33,8	201	
7	12,0	84,9	0	3,1	192	
8	24,4	75,0	0	0,6	168	
9	56,4	31,9	0	11,7	266	
10	0	58,6	7,6	33,8	340	IX
11	0	0,8	0	99,2	254	XI
12	0	27,9	0	72,1	247	
13	0	35,3	0	64,7	346	
14-32	0	0	0	100	200	XV
Mittel:	5,7	21,0	0,9	72,4		

Tab. 17: Segregation des Antimycinmarkers $\text{ana}^{\text{r}}-8$ und des Chloramphenicolmarkers $\text{cap}^{\text{r}}-1-3\text{C}$ in diploide Zellen nach Zygotenbildung. Zahlen in %.

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^- \text{ana}^{\text{r}}-8$ (P1) x $\text{mei1-102 arg1-1 cap}^{\text{r}}-1-3\text{C}$ (P2)

Zygote Nr.	P1 $\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{S}}$	P2 $\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{R}}$	R1 $\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{R}}$	R2 $\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{S}}$	Anzahl unters. Kolon.	Klasse
1	59,0	2,6	0	38,4	232	III
2	48,3	1,4	0	50,3	145	
3	73,2	3,7	0	23,1	269	
4	23,4	0,7	0	75,9	295	
5	40,8	6,8	0	52,4	147	
6	93,9	6,1	0	0	49	IV
7	98,2	1,8	0	0	57	
8	98,0	0	0	2,0	101	VII
9	83,6	0	0	16,4	73	
10	91,5	0	0	8,5	82	
11	80,5	0	0	19,5	82	
12	10,8	0	0	89,2	74	
13	81,0	0	0	19,0	58	
14	73,1	0	0	26,9	93	
15-26	100	0	0	0	100	VIII
27	0	80,0	0	20,0	170	XI
28-32	0	0	0	100	100	XV
Mittel:	67,4	3,2	0	29,4		

Tab. 18: Segregation des Chloramphenicolmarkers $\text{cap}^{\text{r}}\text{-1-2C}$
und des Erythromycinmarkers $\text{ery}^{\text{r}}\text{-16-14B}$ in diploide
Zellen nach Zygotenbildung. Zahlen in %.

Kreuzung: $\text{meil-102 ade7-50 cap}^{\text{r}}\text{-1-2C (P1)} \times$
 $\text{ura1-171 h}^{\text{r}}\text{-ery}^{\text{r}}\text{-16-14B (P2)}$

Zygote Nr.	P1 $\text{C}^{\text{R}}\text{E}^{\text{S}}$	P2 $\text{C}^{\text{S}}\text{E}^{\text{R}}$	R1 $\text{C}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$	R2 $\text{C}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$	Anzahl unters. Kolon.	Klasse
1	1, 1	94, 3	0	4, 6	174	III
2	18, 2	81, 5	0	0, 3	319	
3	0, 5	47, 9	0	51, 6	109	
4	1, 7	64, 7	0	33, 6	289	
5	5, 6	89, 8	0	4, 6	374	
6	6, 6	88, 5	0	4, 9	61	
7	4, 6	85, 4	0	10, 0	240	
8	1, 1	84, 8	0	14, 1	178	
9	1, 7	91, 7	0	6, 6	361	
10	8, 7	82, 2	0	9, 1	275	
11	0, 9	97, 7	0	3, 3	300	
12	8, 7	88, 0	0	3, 3	300	
13	2, 2	97, 8	0	0	89	IV
14	3, 9	96, 1	0	0	76	
15	1, 9	98, 1	0	0	104	
16	9, 3	90, 7	0	0	247	
17	9, 5	90, 5	0	0	243	
18	11, 0	89, 0	0	0	255	
19	0	99, 6	0	0, 4	275	XI
20	0	82, 0	0	18, 0	300	
21	0	85, 9	0	27, 8	187	
22	0	85, 9	0	14, 1	198	
23	0	98, 5	0	1, 5	136	
24	0	93, 9	0	6, 1	66	
25	0	60, 8	0	39, 2	222	
26	0	75, 4	0	24, 6	118	
27-35	0	100	0	0	200	XII
Mittel:	2, 8	89, 3	0	7, 9		

Tab. 19: Segregation des Antimycinmarkers $\text{ana}^{\text{r}}-8$ und des Erythromycinmarkers $\text{ery}^{\text{r}}-16$ in diploide Zellen nach Zygotenbildung. Kreuzung in cis - Konfiguration. Zahlen in %.

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^- \text{ ana}^{\text{r}}-8 \text{ ery}^{\text{r}}-16$ (P1) x
 $\text{meil-102 ural-171 arg1-1}$ (P2)

Zygote Nr.	P1 $\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$	P2 $\text{A}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$	R1 $\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{S}}$	R2 $\text{A}^{\text{S}}\text{E}^{\text{R}}$	Anzahl unters. Kolon.	Klasse
1	11,2	84,5	3,8	0,5	446	I
2	9,2	43,1	9,8	37,9	306	
3	3,5	53,7	0,4	42,4	231	
4	35,8	64,2	0	0	332	IV
5	0	82,3	2,1	15,6	333	IX
6	0	99,7	0,3	0	309	X
7	0	3,2	96,8	0	250	
8	0	84,9	0	15,1	476	XI
9	0	49,5	0	50,5	444	
10	0	84,5	0	15,5	427	
11-23	0	100	0	0	300	XII
Mittel:	2,6	84,8	4,9	7,7		

Tab. 20: Segregation des Antimycinmarkers $\text{ana}^{\text{r}}-8$ und des Chloramphenicolmarkers $\text{cap}^{\text{r}}-1$ in diploide Zellen nach Zygotenbildung. Kreuzung in cis - Konfiguration. Zahlen in %.

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^- \text{ana}^{\text{r}}-8 \text{cap}^{\text{r}}-1$ (P1) x
 $\text{meil-102 ural-171 arg1-1}$ (P2)

Zygote Nr.	P1 $\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{R}}$	P2 $\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{S}}$	R1 $\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{S}}$	R2 $\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{R}}$	Anzahl unters. Kolon.	Klasse
1	4,1	95,9	0	0	73	IV
2	3	97,0	0	0	99	
3	1,1	98,6	0	0	70	
4	0	38,6	61,4	0	83	X
5	0	99,4	0,6	0	160	
6	0	97,8	0	0,2	185	XI
7	0	97,0	0	3,0	440	
8	0	98,5	0	1,5	203	
9	0	93,5	0	6,5	155	
10	0	94,6	0	5,4	92	
11	0	93,6	0	6,4	47	
12-61	0	100	0	0	150	XII
Mittel:	0,1	98,4	1,1	0,4		

Tab. 21: Segregation des Chloramphenicolmarkers $\text{cap}^{\text{r}}-1$ und des Erythromycinmarkers $\text{ery}^{\text{r}}-16$ in diploide Zellen nach Zygotenbildung. Kreuzung in cis - Konfiguration. Zahlen in %.

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^- \text{cap}^{\text{r}}-1 \text{ery}^{\text{r}}-16$ (P1) x
 $\text{meil-102 ura1-171 arg1-1}$ (P2)

Zygoten Nr.	P1 $\text{C}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$	P2 $\text{C}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$	R1 $\text{C}^{\text{R}}\text{E}^{\text{S}}$	R2 $\text{C}^{\text{S}}\text{E}^{\text{R}}$	Anzahl unters.	Klasse
1	0	78,2	1,4	20,4	147	IX
2	0	68,2	0	31,8	311	XI
3	0	96,9	0	3,1	97	
4	0	93,4	0	6,6	106	
5	0	81,8	0	18,2	77	
6	0	97,4	0	2,6	78	
7	0	93,8	0	6,2	64	
8	0	73,6	0	26,4	129	
9-48	0	100	0	0	150	XII
Mittel:	0	97,57	0,03	2,4		

Tab. 22: Segregation des Antimycinmarkers ana^r -8, Chloramphenicolmarkers cap^r -1 und Erythromycinmarkers ery^r -16 in diploide Zellen nach Zygotenbildung. Kreuzung in cis - Konfiguration. Zahlen in %. Reihenfolge A - C - E.

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^r \text{ ana}^r$ -8 cap^r -1 ery^r -16 (P1) $\times$ $\text{mei1-102 ural-171 arg1-1}$ (P2)

Zygoten Nr.	P1		R e k o m b i n a n t e n					Anzahl Kolonien	
	RRR	SSS	RSS	SSR	SRS	RSR	RRS	SRR	
1-15	0	100	0	0	0	0	0	0	100
16	1,7	98,3	0	0	0	0	0	0	120
17	0	81,3	0	0	0	18,7	0	0	134
18	0	44,9	0	0	0	55,1	0	0	107
19	0	97,4	0	0	0	2,6	0	0	115
20	0	50,5	0	44,6	0	4,9	0	0	101
21	0	98,8	0	1,2	0	0	0	0	86
22	0	91,8	0	8,2	0	0	0	0	110
23	0	76,5	23,5	0	0	0	0	0	115
24	0	92,8	7,2	0	0	0	0	0	97
Mittel:	0,1	93,0	1,3	2,3	0	3,3	0	0	

Tab. 23: Prozentsatz reinerbiger Zygoten - Kolonien 24 Stunden
nach Kreuzung. Pro Zygoten-Kolonie 100 Kolonien ausgewertet.

Kreuzung	Parental- typen	Rekom. typen	Anzahl Zygotenkol.
$\text{ana}^{\text{r}}-8 \times \text{ery}^{\text{r}}-16-9\text{B}$		$\text{A}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$ 59,4	32
$\text{ana}^{\text{r}}-8 \times \text{cap}^{\text{r}}-1-3\text{C}$	$\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{S}}$ 37,5	$\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{S}}$ 15,6	32
$\text{ery}^{\text{r}}-16-14\text{B} \times \text{cap}^{\text{r}}-1-2\text{C}$	$\text{C}^{\text{S}}\text{E}^{\text{R}}$ 25,7		35
$\text{ana}^{\text{r}}-8 \text{ery}^{\text{r}}-16 \times \text{meil}-102$	$\text{A}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$ 56,5		23
$\text{ana}^{\text{r}}-8 \text{cap}^{\text{r}}-1 \times \text{meil}-102$	$\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{S}}$ 82,0		61
$\text{ery}^{\text{r}}-16 \text{cap}^{\text{r}}-1 \times \text{meil}-102$	$\text{E}^{\text{S}}\text{C}^{\text{S}}$ 83,3		48
$\text{ana}^{\text{r}}-8 \text{cap}^{\text{r}}-9 \text{ery}^{\text{r}}-16 \times \text{meil}-102$	$\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$ 62,5		24

Im Mittel 60,4 % reinerbige Zygoten-Kolonien pro Kreuzung.

1.5.2. Segregation der Resistenzmarker in diploide Zellen nach Zygotenbildung und folgender Nachbebrütung

Im Kapitel 1.5.1. haben die Analysen einzelner Zygoten - Kolonien gezeigt, dass die Segregation der Resistenzmarker noch nicht abgeschlossen ist. Um zu untersuchen, wie lange dieses heteroplasmatische Stadium erhalten bleibt, werden die Diploiden 24 Stunden nach der Kreuzung nicht sofort auf Minimalmedium plattiert, sondern für 7 Generationen in flüssigem Hefeextrakt - Medium mit 7 % Glucose in statischer Kultur vermehrt. Dann wird auf Minimalmedium mit Magdalarot plattiert, einzelne Zygoten - Kolonien isoliert, suspendiert, erneut auf Minimalmedium plattiert und die diploiden Kolonien auf Selektivmedien gestempelt. Die Tabellen 24 und 25 zeigen die Ergebnisse für 2 Kreuzungen, Tabelle 26 eine Zusammenfassung der Prozentsätze reinerbiger Zygoten - Kolonien. Dieser Befund bedeutet, dass auch nach einer 7 Generationen dauernden Nachbebrütung (nach insgesamt etwa 50 Generationen) noch 14 % der Zygoten - Kolonien heteroplasmatisch sind.

Kreuzung: ade7-50 h⁻ana^r-8 (P1) ×

meil-102 ura1-171 ery^r-16-12B (P2)

Zygoten Nr.	P1 A ^R E ^S	P2 A ^S E ^R	R1 A ^R E ^R	R2 A ^S E ^S	Anzahl unters. Kolon.	Klasse
1	66,0	0	34,0	0	150	VI
2	80,2	0	0	19,8	96	VII
3-4	100	0	0	0	100	VIII
5-10	0	100	0	0	100	XII
11-12	0	0	0	100	100	XV
Mittel:	28,9	50,0	2,8	18,3		

Tab. 24: Segregation des Antimycinmarkers ana^r-8 und des Erythromycinmarkers ery^r-16-12B in diploide Zellen nach Zygotenbildung und folgender Nachbebrütung. Die Angaben sind in %. Für die reinerbigen Zygoten wurden jeweils etwa 100 Kolonien ausgewertet.

Kreuzung: ura1-171 h⁻ery^r-16-14B (P1) ×

meil-102 ade7-50 cap^r-1-2C (P2)

Zygoten Nr.	P1 E ^R C ^S	P2 E ^S C ^R	R1 E ^R C ^R	R2 E ^S C ^S	Anzahl unters. Kolon.	Klasse
1	0,8	0	0	99,2	132	VII
2-8	100	0	0	0	100	VIII
9	0	0	0	100	100	XV
Mittel:	77,9	0	0	22,1		

Tab. 25: Segregation des Erythromycinmarkers ery^r-16-14B und des Chloramphenicolmarkers cap^r-1-2C in diploide Zellen nach Zygotenbildung und folgender Nachbebrütung. Die Angaben sind in %. Für die reinerbigen Zygoten wurden jeweils etwa 100 Kolonien ausgewertet.

Tab. 26: Prozentsatz reinerbiger Zygoten - Kolonien nach 7 Generationen Nachbebrütung der Diploiden. Pro Zygoten - Kolonie 100 Kolonien ausgewertet.

Kreuzung	P1	P2	R1	R2	Anzahl Zygotenkol.
ana ^r -8 (P1) x ery ^r -16-12B (P2)	A ^R E ^S 16,7	A ^S E ^R 50,0	A ^R E ^R 0	A ^S E ^S 16,7	12
cap ^r -1-2C (P1) x ery ^r -16-14B (P2)	C ^R E ^S 0	C ^S E ^R 77,8	C ^R E ^R 0	C ^S E ^S 11,1	9

Im Mittel 86,2 % reinerbige Zygoten pro Kreuzung.

1.5.3. Nachweis der Segregation der Resistenzmarker in haploide Zellen nach Sporenbildung (Tetradenanalysen)

Zur genaueren Untersuchung der Segregationsvorgänge in den Sporen werden die aus den Sporen einer Tetrade herangewachsenen Kolonien suspendiert, auf Vollmedium plattiert und auf Selektivmedien zur Bestimmung der Phänotypen gestempelt. Als doppelresistent werden nur jene Kolonien gewertet, die auf Medien wachsen, welche beide Antibiotica gleichzeitig enthalten. Die Ergebnisse von Kreuzungen in trans - Konfiguration sind in den Tabellen 27, 28, 29, 33, 34 und 35 dargestellt, von den Kreuzungen in cis - Konfiguration in den Tabellen 30, 31, 32. Etwa 82 % der Sporen - Kolonien können im Rahmen des untersuchten Stichprobenumfanges als reinerbig bezeichnet werden. Die Segregation der Resistenzmarker in haploide Zellen nach Sporenbildung ist auch in den Sporen - Kolonien noch nicht abgeschlossen.

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse:

- 45 Tetraden zeigen 4 homoplasmatische Sporen
(z. B. Tab. 27, Tetrade 6),
36 Tetraden zeigen 3 homoplasmatische Sporen und 1 hetero-
plasmatische (z. B. Tab. 27, Tetrade 5),
13 Tetraden zeigen 2 homoplasmatische Sporen und 2 hetero-
plasmatische (z. B. Tab. 27, Tetrade 12)
- In Anlehnung an die für die Zygoten - Analysen eingeführte
Nomenklatur (Tabelle 15) können auch die Sporen in diese
Klassen eingeteilt werden. Es gibt also Sporen - Kolonien,
die sowohl beide Parental- als auch beide Rekombinantentypen
enthalten, und solche, denen ein oder mehrere Genotypen fehlen.
- Nulliparentale unirekombinante Sporen - Kolonien sind nur vom
doppelsensiblen Genotyp (z. B. Tab. 27, Spore 6D), während
der doppelresistente Genotyp nicht homoplasmatisch vorkommt.
- Vergleicht man die Zahlenverhältnisse der Genotypen von
Sporen - Kolonien der gleichen Klasse, so ergeben sich starke
Schwankungen, sowohl für Parental- als auch für Rekombinanten-
typ.

Tab. 27: Segregation des Antimycinmarkers ana^{r} -8 und des Erythromycinmarkers ery^{r} -16-7A in haploide Zellen nach Sporenbildung (Tetradenanalysen). Die Angaben sind in %. Kreuzung in trans - Konfiguration.

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^{-}\text{ana}^{\text{r}}-8$ (P1) x $\text{ura1-171 h}^{+}\text{ery}^{\text{r}}-16-7A$ (P2)

Spore Nr.	P1 $\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{S}}$	P2 $\text{A}^{\text{S}}\text{E}^{\text{R}}$	R1 $\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$	R2 $\text{A}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$	Anzahl RC Kolonien	Anzahl RD Kol.	Klasse
1A	100	0	0	0	308	0	VIII
1B	0	100	0	0	171	0	XII
1C	0	100	0	0	325	0	XII
1D	52,9	9,2	15,0	22,9	153	0	I
2A	0	100	0	0	330	0	XII
2B	100	0	0	0	456	0	VIII
2C	0	100	0	0	412	0	XII
2D	67,6	0	32,4	0	299	1	VI
3A	82,5	0,4	7,6	9,5	251	32	I
3B	0	100	0	0	290	0	XII
3C	100	0	0	0	188	0	VIII
3D	0	100	0	0	382	0	XII
4A	0	100	0	0	366	0	XII
4B	100	0	0	0	330	0	VIII
4C	88,8	0	10,6	0,6	311	0	V
4D	0	100	0	0	320	0	XII
5A	0	100	0	0	416	0	XII
5B	0	100	0	0	296	0	XII
5C	0	100	0	0	264	0	XII
5D	1,6	59,1	32,5	6,8	191	0	I
6A	100	0	0	0	224	0	VIII
6B	0	100	0	0	268	0	XII
6C	0	100	0	0	364	0	XII
6D	0	0	0	100	144	0	XV
7A	0	98,9	1,1	0	372	0	X
7B	100	0	0	0	316	0	VIII
7C	0	98,9	0	1,1	435	0	XI
7D	100	0	0	0	296	0	VIII

Fortsetzung der Tabelle 27:

Spore Nr.	P1 A ^R E ^S	P2 A ^S E ^R	R1 A ^R E ^R	R2 A ^S E ^S	Anzahl RC Kolon.	Anzahl RD Kolon.	Klasse
8A	0	100	0	0	432	0	XII
8B	0	100	0	0	230	0	XII
8C	0	33,2	0	66,8	208	0	XI
8D	37,7	8,7	34,1	19,5	334	5	I
9A	0	100	0	0	362	0	XII
9B	0	100	0	0	328	0	XII
9C	71,8	0,7	25,3	2,2	446	5	I
9D	100	0	0	0	296	0	VIII
10A	99,6	0	0	0,4	262	0	VII
10B	100	0	0	0	396	0	VIII
10C	0	100	0	0	240	0	XII
10D	0	100	0	0	392	0	XII
11A	0	100	0	0	282	1	XII
11B	100	0	0	0	166	0	VIII
11C	100	0	0	0	332	0	VIII
11D	0	100	0	0	248	0	XII
12A	33,5	16,8	19,4	30,3	346	0	I
12B	0	100	0	0	304	0	XII
12C	89,6	0	16,4	0	348	0	VI
12D	0	100	0	0	356	0	XII
13A	100	0	0	0	304	0	VIII
13B	0	0	0	100	298	0	XV
13C	1,7	0	0	98,3	292	1	VII
13D	0	100	0	0	360	0	XII
Mittel	35,1	52,4	3,7	8,8			

Tab. 28: Segregation des Antimycinmarkers $\text{ana}^{\text{r}}-8$ und des Chlor-amphenicolmarkers $\text{cap}^{\text{r}}-1-23\text{A}$ in haploide Zellen nach Sporenbildung (Tetradenanalysen). Kreuzung in trans - Konfiguration. Angaben in %. Für die reinerbigen Sporen wurden jeweils etwa 100 Kolonien ausgewertet.

Kreuzung: $\text{ural-171 h}^- \text{ana}^{\text{r}}-8$ (P1) x $\text{ade7-50h}^+ \text{cap}^{\text{r}}-1-23\text{A}$ (P2)

Tetrade Nr.	P1 $\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{S}}$	P2 $\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{R}}$	R1 $\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{R}}$	R2 $\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{S}}$	Anzahl RC Kolon.	Anzahl RD Kolon.	Klasse
1-11 A	0	100	0	0	100	0	XII
B	100	0	0	0	100	0	VIII
C	100	0	0	0	100	0	VIII
D	0	100	0	0	100	0	XII
12-13 A	100	0	0	0	100	0	VIII
B	0	0	0	100	100	0	XV
C	100	0	0	0	100	0	VIII
D	0	100	0	0	100	0	XII
14 A	100	0	0	0	100	0	VIII
B	0	0	0	100	100	0	XV
C	100	0	0	0	279	1	VIII
D	0	100	0	0	100	0	XII
15 A	0	0	0	100	100	0	XV
B	100	0	0	0	100	0	VIII
C	100	0	0	0	100	0	VIII
D	0	0	0	100	100	0	XV
16 A	89,0	0	11,0	0	301	0	VI
B	0	100	0	0	100	0	XII
C	0	0	0	100	100	0	XV
D	0	100	0	0	100	0	XII
Mittel:	48,2	42,2	0,2	9,4			

Tab. 29: Segregation des Erythromycinmarkers ery^r -16-14B und des Chloramphenicolmarkers cap^r -1-23A in haploide Zellen nach Sporenbildung (Tetradenanalysen). Kreuzung in trans - Konfiguration. Angaben in %. Für die reinerbigen Sporen wurden jeweils etwa 100 Kolonien ausgewertet.

Kreuzung: $ura1-171 h^- ery^r$ -16-14B (P1) x $ade7-50 h^+ cap^r$ -1-23A (P2)

Tetrade Nr.		P1	P2	R1	R2	Anzahl RC Kolon.	Anzahl RD Kolon.	Klasse
		$E^R C^S$	$E^S C^R$	$E^R C^R$	$E^S C^S$			
1-10	A	100	0	0	0	100	0	VIII
	B	100	0	0	0	100	0	VIII
	C	0	100	0	0	100	0	XII
	D	0	100	0	0	100	0	XII
11-12	A	0	0	0	100	100	0	XV
	B	100	0	0	0	100	0	VIII
	C	100	0	0	0	100	0	VIII
	D	0	100	0	0	100	0	XII
13	A	0	0	0	100	100	0	XV
	B	0	0	0	100	100	0	XV
	C	0	100	0	0	100	0	XII
	D	100	0	0	0	100	0	VIII
14	A	6,1	80,2	0	13,7	731	6	III
	B	0	0	0	100	100	0	XV
	C	100	0	0	0	100	0	VIII
	D	100	0	0	0	100	0	VIII
Mittel:		48,3	42,5	0	9,2			

Tab. 30: Segregation des Antimycinmarkers $\text{ana}^{\text{r}}-8$ und des Erythromycinmarkers $\text{ery}^{\text{r}}-16$ in haploide Zellen nach Sporenbildung (Tetradenanalysen). Kreuzung in cis-Konfiguration. Angaben in %. Für die reinerbigen Sporen wurden jeweils etwa 100 Kolonien ausgewertet.

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^{-}\text{ana}^{\text{r}}-8 \text{ery}^{\text{r}}-16$ (P1) x ura1-1/1 h^{+} (P2)

Spore Nr.	P1 $\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$	P2 $\text{A}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$	R1 $\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{S}}$	R2 $\text{A}^{\text{S}}\text{E}^{\text{R}}$	Anzahl RC Kolon.	Anzahl RD Kolon.	Klasse
1A	0	100	0	0	100	0	XII
1B	0	84,2	0	15,8	95	0	XI
1C	0	100	0	0	100	0	XII
1D	61,3	1,1	0	37,6	279	4	III
2A	0	100	0	0	100	0	XII
2B	0	100	0	0	134	2	XII
2C	0	73,5	0	26,5	151	1	XI
2D	100	0	0	0	100	0	VIII
3A	0	97,4	0	2,6	115	0	XI
3B	0	100	0	0	100	0	XII
3C	0	100	0	0	100	0	XII
3D	0	100	0	0	100	0	XII
4A	100	0	0	0	100	0	VIII
4B	0	100	0	0	100	0	XII
4C	100	0	0	0	100	0	VIII
4D	0	100	0	0	100	0	XII
5A	100	0	0	0	100	0	VIII
5B	0	100	0	0	100	0	XII
5C	0	100	0	0	100	0	XII
5D	0	100	0	0	100	0	XII
6A	25,8	74,2	0	0	89	0	IV
6B	0	100	0	0	100	0	XII
6C	2,7	33,2	0,4	63,7	262	0	I
6D	0	100	0	0	100	0	XII
7A	0	100	0	0	100	0	XII
7B	0	100	0	0	100	0	XII
7C	98,4	0	0	1,6	250	0	VII
7D	0	100	0	0	100	0	XII
8A	96,2	0	3,8	0	26	15	VI
8B	0	100	0	0	100	0	XII
8C	0	100	0	0	100	0	XII
8D	0	100	0	0	100	0	XII
Mittel:	21,4	73,9	0,1	4,6			

Tab. 31: Segregation des Antimycinmarkers $\text{ana}^{\text{r}}-8$ und des Chloramphenicolmarkers $\text{cap}^{\text{r}}-1$ in haploide Zellen nach Sporenbildung (Tetradenanalysen). Kreuzungen in cis-Konfiguration. Angaben in %. Für die reinerbigen Sporen wurden jeweils etwa 100 Kolonien ausgewertet.

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^{\text{r}}\text{-ana}^{\text{r}}-8 \text{ cap}^{\text{r}}-1$ (P1) x $\text{ura1-171 h}^{\text{+}}$ (P2)

Spore Nr.	P1 $\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{R}}$	P2 $\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{S}}$	R1 $\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{S}}$	R2 $\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{R}}$	Anzahl RC Kolon.	Anzahl RD Kolon.	Klasse
1A	0	100	0	0	100	0	XII
1B	0	100	0	0	100	0	XII
1C	0	0	0	0	100	100	---
1D	0	100	0	0	100	0	XII
2A	0	96,4	0,5	3,1	193	0	IX
2B	0	100	0	0	100	0	XII
2C	100	0	0	0	100	0	VIII
2D	0	100	0	0	100	0	XII
3A	0	100	0	0	100	0	XII
3B	0	100	0	0	100	0	XII
3C	99,1	0	0	0,9	117	1	VII
3D	0	100	0	0	100	0	XII
4A	0	100	0	0	100	0	XII
4B	16,7	1,0	0,5	81,8	384	3	I
4C	0	100	0	0	100	0	XII
4D	0	100	0	0	100	0	XII
5A	0	100	0	0	100	0	XII
5B	0	100	0	0	100	0	XII
5C	0	100	0	0	100	0	XII
5D	1,3	0	0	98,7	225	5	VII
6A	0	100	0	0	100	0	XII
6B	0	49,3	50,7	0	146	0	XI
6C	0	100	0	0	100	0	XII
6D	0	100	0	0	100	0	XII
7A	0	100	0	0	100	0	XII
7B	0	100	0	0	100	0	XII
7C	0	100	0	0	100	0	XII
7D	17,6	14,2	12,2	56,0	409	7	I
8A	0	100	0	0	100	0	XII
8B	0	1,4	12,3	86,3	73	0	IX
8C	80,8	1,1	0	18,1	177	0	III
8D	0	100	0	0	100	0	XII
Mittel:	10,2	76,2	2,5	11,1			

Tab. 32: Segregation des Chloramphenicolmarkers $\text{cap}^{\text{r}}-1$ und des Erythromycinmarkers $\text{ery}^{\text{r}}-16$ in haploide Zellen nach Sporenbildung (Tetradenanalysen). Kreuzung in cis - Konfiguration. Die Angaben sind in %. Für die reinerbigen Sporen wurden jeweils etwa 100 Kolonien ausgewertet.

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^- \text{cap}^{\text{r}}-1 \text{ery}^{\text{r}}-16$ (P1) x ura1-171 h^+ (P2)

Tetrade Nr.	P1 $\text{C}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$	P2 $\text{C}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$	R1 $\text{C}^{\text{R}}\text{E}^{\text{S}}$	R2 $\text{C}^{\text{S}}\text{E}^{\text{R}}$	Anzahl RC Kolon.	Anzahl RD Kolon.	Klasse
1-2 A	0	100	0	0	100	0	XII
B	0	100	0	0	100	0	XII
C	0	100	0	0	100	0	XII
D	0	100	0	0	100	0	XII
3 A	0	100	0	0	100	0	XII
B	0	100	0	0	1	109	XII
C	0	0	0	100	100	0	XV
D	0	100	0	0	100	0	XII
Mittel:	0	83,4	0	8,3			

Tab. 33: Segregation des Antimycinmarkers $\text{ana}^{\text{r}}-8$, des Erythromycinmarkers $\text{ery}^{\text{r}}-16-15\text{C}$ und des Chloramphenicolmarkers $\text{cap}^{\text{r}}-1-23\text{A}$ in haploide Zellen nach Sporenbildung (Tetradenanalysen). Die Angaben sind in %. Für die reinerbigen Sporen wurden jeweils etwa 100 Kolonien ausgewertet.

R = resistent, S = sensibel ist für die Reihenfolge A-C-E gültig.

Kreuzung: $\text{ura1-171 h}^{\text{r}}\text{ana}^{\text{r}}-8 \text{ery}^{\text{r}}-16-15\text{C}$ (P1) x $\text{ade7-50 h}^{\text{r}}\text{cap}^{\text{r}}-1-23\text{A}$ (P2)

	P1	P2	Rekombinanten						Anzahl	
	RSR	SRS	RSS	SSR	RRS	SRR	RRR	SSS	RC Kolo.	RD Kolo.
1A	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
1B	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0
1C	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
1D	6,8	0	1,6	12,0	0	0	0	79,5	259	0
2A	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
2B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
2C	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
2D	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0
3A	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
3B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
3C	35,0	0,9	0,9	14,1	0,4	1,8	5,5	41,4	220	0
3D	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0
4A	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
4B	87,2	0	0	0	2,1	4,8	5,9	0	188	0
4C	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
4D	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0
5A	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0
5B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
5C	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
5D	0	71,9	17,7	0	10,4	0	0	0	260	0
6A	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0
6B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
6C	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0
6D	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
7A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
7B	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0
7C	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
7D	35,7	27,7	0	0	2,7	1,8	0,9	31,3	224	0
8A	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
8B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
8C	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
8D	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
	27,9	54,8	0,7	4,1	0,5	0,3	0,4	11,3		

Tab. 34 : Segregation des Antimycinmarkers ana^r -8, des Chloramphenicol-markers cap^r -1 und des Erythromycinmarkers ery^r -16-7A in haploide Zellen nach Sporenbildung (Tetradenanalysen). Angaben in %. Für die reinerbigen Sporen wurden jeweils etwa 100 Kolonien ausgewertet.

R=resistent, S=sensibel ist für die Reihenfolge A-C-E gültig.

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^- \text{ana}^r\text{-8 cap}^r\text{-1 (P1) x ura1-171 h}^+ \text{ery}^r\text{-16-7A}$

	P1 RRS	P2 SSR	Rekombinanten						Anzahl	
			RSS	SRS	RSR	SRR	RRR	SSS	Kolo. RC	Kolo. RD
1A	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0
1B	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
1C	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
1D	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
2A	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
2B	91,3	1,7	0,3	0,7	5,0	1,0	0	0	298	5
2C	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
2D	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0
3A	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
3B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
3C	0	0	22,8	0	0	0	0	77,2	79	147
3D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
4A	0	52,3	0	0	0	0	0	47,7	373	0
4B	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
4C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
4D	88,4	0	0,2	9,9	0,2	0,7	0,2	0,4	464	0
5A	98,2	0	0,6	0,6	0,6	0	0	0	356	0
5B	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100
5C	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
5D	0	98,9	0	0	0	0,9	0	0,2	460	0
6A	38,5	21,3	12,4	13,9	13,1	0	0	0,8	122	1
6B	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
6C	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
6D	97,4	0	0	0	1,1	0	1,5	0	264	3
7A	84,8	0	0,2	0,6	6,9	0,2	7,3	0	506	8
7B	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
7C	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
7D	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
8A	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
8B	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
8C	0	74,7	0	0	0	25,3	0	0	597	0
8D	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
9A	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0
9B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
9C	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0
9D	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
	21,2	28,7	1,1	3,8	0,8	0,9	0,3	43,2	Mittel	

Tab. 35: Segregation des Antimycinmarkers ana^r -8, des Chloramphenicol-markers cap^r -9 und des Erythromycinmarkers ery^r -16 in haploide Zellen nach Sporenbildung (Tetradenanalysen). Angaben in %. Für die reinerbigen Sporen wurden jeweils etwa 100 Kolonien ausgewertet.

R = resistent, S = sensibel ist für die Reihenfolge A-C-E gültig.

Kreuzung: $ade7-50 h^- ana^r-8 cap^r-9 ery^r-16$ (P1) x $ura1-171 h^+$

	P1 RRR	P2 SSS	Rekombinanten						Anzahl Kolo. Kolo.	
			RSS	SRS	SSR	RSR	RRS	SRR	RC	RD
1A	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
1B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
1C	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
1D	0	0	0	0	0	100	0	0	100	0
2A	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
2B	0	2,6	0	0,7	6,6	90,1	0	0	152	0
2C	0	0	0	0	0	100	0	0	100	0
2D	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
3A	0	35,9	2,6	0	53,8	7,7	0	0	39	0
3B	0	0	0	0	23,1	76,9	0	0	143	0
3C	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
3D	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
4A	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
4B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
4C	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
4D	0	1,7	0	0	9,6	88,7	0	0	115	0
5A	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
5B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
5C	3,5	36,8	14,9	19,9	7,0	17,9	0	0	201	0
5D	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
6A	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
6B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
6C	0	8,4	12,9	0	14,6	64,1	0	0	178	0
6D	0	6,8	0	0	54,6	38,6	0	0	207	0
7A	0	0	0	0	0	100	0	0	100	0
7B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
7C	0	86,3	0	0	13,7	0	0	0	219	0
7D	0	44,4	0	0	0	55,6	0	0	72	0

Fortsetzung der Tabelle 35:

	P1	P2	R e k o m b i n a n t e n						Anzahl Kolonien	
	RRR	SSS	RSS	SRS	SSR	RSR	RRS	SRR	RC	RD
8A	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
8B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
8C	0	0	0	0	100	0	0	0	100	0
8D	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
9A	0	17,5	80,0	0	0	2,5	0	0	40	89
9B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
9C	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
9D	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
10A	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
10B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
10C	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
10D	0	93,2	2,3	0	0	4,5	0	0	44	0
11A	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0
11B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
11C	0	34,3	0	5,5	16,4	40,4	3,4	0	146	53
11D	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
12A	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
12B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
12C	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
12D	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
13A	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
13B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
13C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
13D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
14A	0	0	0,6	0	10,0	89,4	0	0	180	0
14B	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
14C	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
14D	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
15A	23,6	1,2	0	36,0	0	37,9	0	1,2	161	0
15B	0	0	0	0	35,2	64,8	0	0	142	0
15C	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
15D	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0
	2,22	71,4	2,0	1,1	6,0	17,2	0,06	0,02	Mittelwerte	

Tab. 36: Prozentsatz reinerbigiger Sporen (Tetradenanalysen). Ergebnisse aus den Tabellen 27 - 35.
Pro Sporen - Kolonie 100 Kolonien ausgewertet.

Kreuzung	P1	P2	R1	R2	Anzahl RD Kolonien	Summe Sporen %	Anzahl RC Kolonien
$\text{ana}^{\text{r}}-8$ (P1)	$\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{S}}$	$\text{A}^{\text{S}}\text{R}$	$\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$	$\text{A}^{\text{S}}\text{S}$			
$\times \text{ery}^{\text{r}}-16-7\text{A}$ (P2)	23,1	44,2	0	3,9	0	71,2	52
$\text{ana}^{\text{r}}-8$ (P1)	$\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{S}}$	$\text{A}^{\text{S}}\text{R}$	$\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{R}}$	$\text{A}^{\text{S}}\text{S}$			
$\times \text{cap}^{\text{r}}-1-23\text{A}$ (P2)	45,3	42,2	0	9,4	0	96,9	64
$\text{cap}^{\text{r}}-1-23\text{A}$ (P1)	$\text{C}^{\text{R}}\text{E}^{\text{S}}$	$\text{C}^{\text{S}}\text{R}$	$\text{C}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$	$\text{C}^{\text{S}}\text{S}$			
$\times \text{ery}^{\text{r}}-16-14\text{B}$ (P2)	41,1	48,2	0	8,9	0	98,2	56
$\text{ana}^{\text{r}}-8 \text{ery}^{\text{r}}-16$ (P1)	$\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$	$\text{A}^{\text{S}}\text{S}$	$\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{S}}$	$\text{A}^{\text{S}}\text{R}$			
$\times \text{ural}^{\text{r}}-171 \text{h}^+$ (P2)	12,5	59,4	0	0	0	71,9	32
$\text{ana}^{\text{r}}-8 \text{cap}^{\text{r}}-1$ (P1)	$\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{R}}$	$\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{S}}$	$\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{S}}$	$\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{R}}$			
$\times \text{ural}^{\text{r}}-171 \text{h}^+$ (P2)	3,1	68,8	0	0	1	75,0	31
$\text{cap}^{\text{r}}-1 \text{ery}^{\text{r}}-16$ (P1)	$\text{C}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$	$\text{C}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$	$\text{C}^{\text{R}}\text{E}^{\text{S}}$	$\text{C}^{\text{S}}\text{E}^{\text{R}}$			
$\times \text{ural}^{\text{r}}-171 \text{h}^+$ (P2)	0	83,3	0	8,3	0	91,6	12
$\text{ana}^{\text{r}}-8 \text{ery}^{\text{r}}-16-15\text{C}$ (P1)	$\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$	C^{R}	E^{R}	$\text{A}^{\text{S}}\text{S}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$			
$\times \text{cap}^{\text{r}}-1-23\text{A}$ (P2)	21,9	50,0	3,1	6,3	1	84,4	31
$\text{ana}^{\text{r}}-8 \text{cap}^{\text{r}}-1$ (P1)	$\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{R}}$	E^{R}	C^{R}	$\text{A}^{\text{S}}\text{S}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$			
$\times \text{ery}^{\text{r}}-16-7\text{A}$ (P2)	5,6	19,4	2,8	36,1	3	72,2	33
$\text{ana}^{\text{r}}-8 \text{cap}^{\text{r}}-9 \text{ery}^{\text{r}}-16$ (P1)	$\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$	$\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$	F^{R}	$\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$			
$\times \text{ural}^{\text{r}}-171 \text{h}^+$ (P2)	1,7	61,7	1,7	5,0	2	75,1	58

Im Mittel 81,8 % reinerbige Sporen - Kolonien pro Kreuzung.

1.5.4. Segregation der Resistenzmarker in haploide Zellen

während und nach Zwischenbebrütung der Diploiden

Nach etwa 5 Generationen Zwischenbebrütung der Diploiden in Hefeextrakt - Medium mit 7 % Glucose in statischer Kultur bei 23°C werden 0,2 ml der Suspension auf Malzmedium-Schrägröhrchen gegeben und nach 3tägiger Inkubation bei 23°C Tetradenanalysen vorgenommen. Die Tabellen 37, 38 und 39 zeigen die Ergebnisse der einzelnen Tetraden. Der Prozentsatz reinerbiger Sporen beträgt ohne Zwischenbebrütung 81,8 % (Tab. 36), nach Zwischenbebrütung 93,6 % (Tab. 40). 6,4 % der Sporen sind selbst nach 5 Generationen dauernder Zwischenbebrütung noch heteroplasmatisch.

Tab. 37: Segregation des Antimycinmarkers ana^R -8 und des Erythromycinmarkers ery^R -16-7A in haploide Zellen nach Sporenbildung (Tetradenanalysen) während und nach Zwischenbebrütung der Diploiden. Kreuzung in trans - Konfiguration. Zahlen in %. Pro reinerbige Spore wurden etwa 100 Kolonien ausgewertet.

Kreuzung: $ade7-50 h^- ana^R$ -8 (P1) $\times$ $ura1-171 h^+ ery^R$ -16-7A (P2)

Spore Nr.	P1 $A^R E^S$	P2 $A^S E^R$	R1 $A^R E^R$	R2 $A^S E^S$	Anzahl Kolonien		Klasse
					RC	RD	
1A	0	49,1	0	50,9	230	0	XI
1B	1,3	36,3	59,2	3,2	157	0	I
1C	0	100	0	0	100	0	XII
1D	0	100	0	0	100	0	XII
2A	0	0	0	0	0	100	---
2B	100	0	0	0	100	0	VIII
2C	0	100	0	0	100	0	XII
2D	0	100	0	0	100	0	XII
3A	0	100	0	0	100	0	XII
3B	0	100	0	0	100	0	XII
3C	100	0	0	0	100	0	VIII
3D	100	0	0	0	100	0	VIII
	27,4	62,3	5,4	4,9	Mittelwerte		

Tab. 38: Segregation des Chloramphenicolmarkers cap^R -1-23A und des Erythromycinmarkers ery^R -16-14B in haploide Zellen nach Sporenbildung (Tetradenanalysen) während und nach Zwischenbebrütung der Diploiden. Kreuzung in trans - Konfiguration. Angaben in %. Pro reinerbige Spore wurden etwa 100 Kolonien ausgewertet.

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^+ \text{cap}^R$ -1-23A (P1) $\times$ $\text{ura1-171 h}^- \text{ery}^R$ -16-14B (P2)

Spore Nr.	P1	P2	R1	R2	Anzahl Kolonien		Klasse
	$\text{C}^R \text{E}^S$	$\text{C}^S \text{E}^R$	$\text{C}^R \text{E}^R$	$\text{C}^S \text{E}^S$	RC	RD	
1-4 A	100	0	0	0	100	0	VIII
B	100	0	0	0	100	0	VIII
C	0	100	0	0	100	0	XII
D	0	100	0	0	100	0	XII
5-7 A	100	0	0	0	100	0	VIII
B	0	0	0	100	100	0	XV
C	0	100	0	0	100	0	XII
D	0	100	0	0	100	0	XII
8 A	100	0	0	0	100	0	VIII
B	100	0	0	0	100	0	VIII
C	100	0	0	0	100	0	VIII
D	0	100	0	0	100	0	XII
9 A	0	100	0	0	100	0	XII
B	0	100	0	0	100	0	XII
C	0	100	0	0	100	0	XII
D	0	0	0	100	100	0	XV
10 A	100	0	0	0	100	0	VIII
B	100	0	0	0	100	0	VIII
C	0	100	0	0	100	0	XII
D	0	0.4	0	99,6	265	0	XI
	40,0	47,5	0	12,5	Mittelwerte		

Tab. 39: Segregation des Antimycinmarkers ana^r -8 und des Chloramphenicolmarkers cap^r -1-23A in haploide Zellen nach Sporenbildung (Tetradenanalysen) während und nach Zwischenbebrütung der Diploiden, Kreuzung in trans - Konfiguration. Angaben in %. Pro reinerbige Spore wurden etwa 100 Kolonien ausgewertet.

Kreuzung: $\text{ura1-171 h}^- \text{ana}^r$ -8 (P1) x $\text{ade7-50 h}^+ \text{cap}^r$ -1-23A (P2)

Spore Nr.	P1 $\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{S}}$	P2 $\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{R}}$	R1 $\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{R}}$	R2 $\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{S}}$	Anzahl Kolonien		Klasse
					RC	RD	
1-6 A	0	100	0	0	100	0	XII
B	0	100	0	0	100	0	XII
C	100	0	0	0	100	0	VIII
D	100	0	0	0	100	0	VIII
	50,0	50,0	0	0	Mittelwerte		

Tab. 40: Prozentsatz reinerbiger Sporen nach 5 Generationen langer Zwischenbebrütung der Diploiden in Hefeextrakt - Medium mit 7 % Glucose. Ergebnisse aus den Tabellen 37, 38, 39. Die ersten 3 Kreuzungen der Tabelle 36 sind identische Ansätze. Pro Sporen - Kolonie 100 Zellen ausgewertet.

Kreuzung	P1	P2	R1	R2	Anzahl RD Sporenk.	Summe %	Anzahl RC Sporenk.
ana^r -8 (P1) x ery^r -16-7A (P2)	$\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{S}}$	$\text{A}^{\text{S}}\text{E}^{\text{R}}$	$\text{A}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$	$\text{A}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$	0	83,3	12
ana^r -8 (P1) x cap^r -1-23A (P2)	$\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{S}}$	$\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{R}}$	$\text{A}^{\text{R}}\text{C}^{\text{R}}$	$\text{A}^{\text{S}}\text{C}^{\text{S}}$	0	100	24
cap^r -1-23A (P1) x ery^r -16-14B (P2)	$\text{C}^{\text{R}}\text{E}^{\text{S}}$	$\text{C}^{\text{S}}\text{E}^{\text{R}}$	$\text{C}^{\text{R}}\text{E}^{\text{R}}$	$\text{C}^{\text{S}}\text{E}^{\text{S}}$	0	97,5	40

Im Mittel 93,6 % reinerbige Sporen pro Kreuzung.

1.5.5. Zusammenfassung des Kapitels Segregation

- 1.) Es gibt einen sehr schnellen Segregationsvorgang, der zu uniparentalen und unirekombinanten (nur die doppelsensible Klasse) Zygoten - bzw. Sporen - Kolonien führt.
- 2.) Nachbebrütung der Diploiden vor der Zygoten - Analyse bzw. Zwischenbebrütung der Diploiden vor der Sporen - Analyse ergeben einen grösseren Prozentsatz homoplasmatischer Zygoten (86 % statt 60 %) bzw. Sporen (94 % statt 82 %).
- 3.) Es gibt andererseits einen länger andauernden Segregationsvorgang; die Zygoten- bzw. Sporen - Kolonien spalten nach 50 Generationen immer noch in verschiedene Genotypen auf.
- 4.) Beide Arten des Segregationsverhaltens sind in Zygoten und Sporen zu beobachten; übereinstimmend kommen die Klassen II, XIII und XIV nicht vor. Die Tabelle 42 zeigt in vergleichender Weise die Ergebnisse von Zygoten und Sporen.
- 5.) Die Häufigkeit der Genotypen von Zygoten- bzw. Sporen - Kolonien der gleichen Klasse zeigt starke Schwankungen.

Tab. 41: Einteilung der Zygoten- bzw. Sporen - Kolonien in Klassen und ihre Häufigkeit des Vorkommens.

Ergebnisse aus 3 Kreuzungen in cis-Konfiguration und 3 Kreuzungen in trans-Konfiguration.

Klasse	Terminologie	Z Y G O T E N				S P O R E N			
		cis		trans		cis		trans	
		Zyg. kol. Anzahl	%	Zyg. kol. Anzahl	Summe Zyg. kol. Anzahl	Zyg. kol. Anzahl	%	Zyg. kol. Anzahl	Summe Zyg. kol. Anzahl
I	biparental	3	3,0	4	7	3		4	9
II	"	0	0	0	0	0		0	0
III	"	0		22	22	2	9,5	1	3
IV	"	4	5,2	8	12	1		0	1
V	uniparental 1	0	0	0	0	0		1	1
VI	"	0	0	0	0	1		3	4
VII	"	0		15	15	3	6,5	2	5
VIII	"	0		21	21	5	9,1	69	74
IX	uniparental 2	2		1	3	2		0	2
X	"	11	4,8	0	11	0		1	1
XI	"	9	5,6	4	13	4		2	6
XII	"	103	44,6	0	103	53		74	127
XIII	nulliparental	0	0	0	0	0		0	0
XIV	"	0	0	0	0	0		0	0
XV	"	0	10,4	24	24	1		13	14
									5,7

1. 6. Nachweis von Rekombinationsvorgängen

1. 6. 1. im meiotischen System

Ein Weg zur Erstellung einer Genkarte ist, Rekombinationshäufigkeiten zwischen mitochondrialen Markern zu bestimmen. Es wurden deshalb 2-Faktor-Kreuzungen (Tab. 42 trans-Konfiguration und Tab. 43 cis-Konfiguration) und 3-Faktor-Kreuzungen (Tab. 44 trans-Kreuzungen) durchgeführt. Vergleicht man die 2-Faktor-Kreuzungen (Tab 43) mit den 3-Faktor-Kreuzungen, indem man den 3. Marker nicht berücksichtigt, so zeigt sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse. Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen sind gering, aber manche Kolonien zeigen, dass die Segregationsvorgänge noch nicht abgeschlossen sind. Dadurch ist die phänotypische Klassifizierung schwierig. Resistente Kolonien werden überschätzt, weil sich in Zellen mit resistentem Phänotyp noch Mitochondrien des sensiblen Typs verbergen können. Für eine Kartierung ist es wichtig, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, was nur mit weitgehend homoplasmatischen Klonen möglich ist. Es gibt 2 experimentelle Möglichkeiten, weitere Segregation zu ermöglichen:

- 1.) Zwischenbebrütung der Diploiden, d.h. Vermehrung der aus Zygoten hervorgegangenen Diploiden, anschliessende Sporulation und direkte Analyse der Sporen - Kolonien.
- 2.) Vermehrung der haploiden Zellen einer Spore durch Resuspension der Sporen - Kolonien, Ausplattierung dieser haploiden Zellen und Analyse der aus ihnen hervorgegangenen Kolonien (zusätzliche 20 Generationen).

Da sich durch die Zwischenbebrütung der Diploiden (Tab. 45) keine signifikante Veränderung in der Häufigkeit der Genotypen ergab, wurde vor Bestimmung des Phänotyps eine Vermehrung der haploiden Zellen einer Sporen - Kolonie durchgeführt. Die Ergebnisse sind im einzelnen im Kapitel Segregation in den Tabellen 27 - 35 darge-

stellt, eine Zusammenfassung der Rekombinationshäufigkeiten in Tabelle 46. Es zeigt sich, dass im Falle der Kreuzungen in trans - Konfiguration (Tab. 46, Kreuzung Nr. 1-3) die Häufigkeit der doppelresistenten Rekombinantentypen nach weiterer Segregation abnimmt. Ebenso wird die Häufigkeit der doppelresistenten Parentaltypen in den Kreuzungen in cis - Konfiguration (Tab. 46, Kreuzung Nr. 4-6) ohne Segregation überschätzt. Die Untersuchungen zur Rekombination der Resistenzmarker in den Sporen führten zu folgenden Ergebnissen. Solange in jedem Kreuzungspartner, wie in Kreuzungen der trans - Konfiguration (Tab. 46, Kreuzung Nr. 1-3) nur 1 Resistenzmarker vorhanden ist, sind die Parentaltypen etwa gleich häufig. Der doppelsensible Rekombinantentyp kommt mit ebenfalls gleicher Häufigkeit vor, nur der doppelresistente Rekombinantentyp, besonders in Kombination mit dem Chloramphenicol - Resistenzmarker, also als $A^R C^R$ und $E^R C^R$ tritt selten auf (Tab. 46, Kreuzung Nr. 2 und 3). Nicht nur als Rekombinante, sondern auch als Parentaltyp zeigt der Stamm, der 2 Resistenzallele trägt, eine starke Benachteiligung. Bei Kreuzungen in cis - Konfiguration tritt der doppelresistente Kreuzungspartner wesentlich seltener auf als der sensible (Tab. 46, Kreuzung Nr. 4-6). Die Häufigkeit des Vorkommens nimmt in folgender Reihenfolge ab: $A^R E^R$, $A^R C^R$, $E^R C^R$.

1.6.2. Nachweis von Rekombinationsvorgängen

im mitotischen System

Hier treten die gleichen Charakteristika auf wie bei den Rekombinationsvorgängen im meiotischen System, nur noch verstärkt. Die Benachteiligung der doppelresistenten Kombination ist sowohl für die Rekombinantentypen wie auch für die Parentaltypen grösser (Tabelle 47). Zusätzlich zeigt sich eine Benachteiligung des Chloramphenicol - Resistenzalleles in Parental- und Rekombinantentypen.

Tab. 42: Freisporanalysen von Kreuzungen in trans - Konfiguration.

Zahlen in %. Ergebnisse jeder Kreuzung stellen einen

Mittelwert aus 7 unabhängigen Versuchen dar.

Kreuzung: ade7-50 h⁻ana^r-8 (P1) x ura1-171 h⁺ery^r-16-7A (P2)

P1 A ^R E ^S	P2 A ^S E ^R	R1 A ^R E ^R	R2 A ^S E ^S	ade	ADE	ADE	ade	Kolo-
				URA	ura	URA	ura	nien
25,4	41,4	11,5	21,7	26,9	23,8	27,2	22,1	2646

Kreuzung: ura1-171 h⁻ana^r-8 (P1) x ade7-50 h⁺cap^r-1-23A (P2)

P1 A ^R C ^S	P2 A ^S C ^R	R1 A ^R C ^R	R2 A ^S C ^S	ade	ADE	ADE	ade	Kolo-
				URA	ura	URA	ura	nien
45,8	47,2	0,9	6,1	27,7	23,3	26,6	22,4	3280

Kreuzung: ade7-50 h⁺cap^r-1-23A (P1) x ura1-171 h⁻ery^r-16-14B (P1)

P1 C ^R E ^S	P2 C ^S E ^R	R1 C ^R E ^R	R2 C ^S E ^S	ade	ADE	ADE	ade	Kolo-
				URA	ura	URA	ura	nien
47,1	45,2	0,1	7,6	29,7	22,3	26,2	21,8	3440

Tab. 43: Freisporanalysen von Kreuzungen in cis - Konfiguration.

Zahlen in %.

Kreuzung: ade7-50 h⁻ana^r-8 ery^r-16 (P1) x ura1-171 h⁺ (P2)

P1 A ^R E ^R	P2 A ^S E ^S	R1 A ^R E ^S	R2 A ^S E ^R	ade	ADE	ADE	ade	Kolo-
				URA	ura	URA	ura	nien
25,6	69,7	1,9	2,9	19,3	53,7	14,6	12,4	573

Kreuzung: ade7-50 h⁻ana^r-8 cap^r-1 (P1) x ura1-171 h⁺ (P2)

P1 A ^R C ^R	P2 A ^S C ^S	R1 A ^R C ^S	R2 A ^S C ^R	ade	ADE	ADE	ade	Kolo-
				URA	ura	URA	ura	nien
36,4	58,8	1,6	3,2	36,4	43,7	9,0	10,0	313

Kreuzung: ade7-50 h⁻cap^r-1 ery^r-16 (P1) x ura1-171 h⁺ (P2)

P1 C ^R E ^R	P2 C ^S E ^S	R1 C ^R E ^S	R2 C ^S E ^R	ade	ADE	ADE	ade	Kolo-
				URA	ura	URA	ura	nien
2,1	75,0	21,1	1,8	26,5	23,2	29,1	21,2	388

Tab. 44: Ergebnisse von 3 - Faktor - Kreuzungen (Antimycinmarker $\text{ana}^{\text{r}}-8$, Chloramphenicolmarker cap^1 und Erythromycinmarker $\text{ery}^{\text{r}}-16-7A$) nach Freisporanalysen. 2 Kreuzungen in trans-, 1 in cis - Konfiguration. Zahlen in %. Die Werte der 1. Kreuzung stellen einen Mittelwert aus 3, die der 2. und 3. Kreuzung aus 4 unabhängigen Kreuzungen dar. R = resistent, S = sensibel für die Reihenfolge der Marker A - C - E.

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^{\text{r}} \text{ana}^{\text{r}}-8 \text{ery}^{\text{r}}-16 (P1) \times \text{ural-171 h}^{\text{r}} \text{cap}^{\text{r}}-1 (P2)$

P1 RRR	P2 SRS	R e k o m b i n a n t e n								ade URA ADE ade ura ura URA ura		Kolo- nien
		RSS	SSR	RRS	SRR	RRR	SSS	ade URA	ADE ura			
30,1	44,9	9,5	4,3	1,9	0	0,5	8,8	26,6	22,2	29,9	21,3	777

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^{\text{r}} \text{ana}^{\text{r}}-8 \text{cap}^{\text{r}}-1 (P1) \times \text{ural-171 h}^{\text{r}} \text{ery}^{\text{r}}-16-7A$

P1 RRR	P2 SSR	R e k o m b i n a n t e n						ade URA ADE ade ura ura URA ura		Kolo- nien		
		RSS	SRS	RSR	SRR	RRR	SSS	ade URA	ADE URA			
21,8	41,1	1,6	1,9	1,7	0,6	2,4	28,9	30,6	25,0	28,1	16,3	943

Kreuzung: $\text{ade7-50 h}^{\text{r}} \text{ana}^{\text{r}}-8 \text{cap}^{\text{r}}-9 \text{ery}^{\text{r}}-16 (P1) \times \text{leu1-32 h}^{\text{r}} (P2)$

P1 RRR	P2 SSS	R e k o m b i n a n t e n						ade ADE ADE ade LEU leu LEU leu			Kolo- nien	
		RSS	SRS	SSR	RSR	RRS	SRR	RRR	SSS	SSS		
13,5	58,5	2,4	0,4	8,3	13,1	0,9	2,9	19,9	32,3	25,5	22,3	785

Tab. 45: Freisporanalysen von Kreuzungen in trans - Konfiguration nach Zwischenbebrütung der Diploiden für 2 und 5 Generationen in Hefeextrakt - Medium mit 7 % Glucose in statischer Kultur bei 23°C. Zahlen in %.

Kreuzung: ade7-50 h⁻ana^r-8 (P1) x ura1-171 h⁺ery^r-16-7A (P2)

Gener. tionen	P1 A ^R E ^S	P2 A ^S E ^R	R1 A ^R E ^R	R2 A ^S E ^S	ade URA	ADE ura	ADE URA	ade ura	Kolo- nien
⁺ 0	25,4	41,4	11,5	21,7	26,9	23,8	27,2	22,1	2646
2	22,2	54,9	16,9	6,0	26,9	26,0	25,4	21,7	764
5	25,6	45,1	13,6	15,7	28,9	23,5	24,1	23,5	956

Kreuzung: ura1-171 h⁻ana^r-8 (P1) x ade7-50 h⁻cap^r-1-23A (P2)

Gener. tionen	P1 A ^R C ^S	P2 A ^S C ^R	R1 A ^R C ^R	R2 A ^S C ^S	ade URA	ADE ura	ADE URA	ade ura	Kolo- nien
⁺ 0	45,8	47,2	0,9	6,1	27,7	23,3	26,6	21,8	3280
2	48,6	50,0	0,4	1,0	25,9	23,9	26,7	23,5	894
5	46,8	48,3	1,2	3,8	24,5	24,3	27,9	23,3	1556

Kreuzung: ura1-171 h⁻ery^r-16-14B (P1) x ade7-50 h⁺cap^r-1-23A (P2)

Gener. tionen	P1 C ^R E ^S	P2 C ^S E ^R	R1 C ^R E ^R	R2 C ^S E ^S	ade URA	ADE ura	ADE URA	ade ura	Kolo- nien
⁺ 0	47,4	45,1	0,1	7,3	29,7	22,3	26,2	21,8	3440
2	54,5	41,6	0,1	3,8	32,9	23,3	24,2	19,6	776
5	56,7	34,5	0	8,8	43,9	19,7	19,0	17,4	1521

+ diese Werte aus Tab. 43 zum Vergleich.

Tab. 46: Rekombinationshäufigkeiten in den Sporen in %.

a) Ergebnisse aus Freisporanalysen (Tab. 42 und 43)

b) Ergebnisse aus Tetradenanalysen (Tab. 7)

c) Ergebnisse aus Analyse einzelner Sporen (Tetraden) nach Resuspendierung der Sporen - Kolonien (20 Generationen Nachzucht). Pro Sporen - Kolonie wurden etwa 100 Kolonien ausgewertet (Tab. 27 - 32).

Nr.	Kreuzung	P1	P2	R1	R2	Summe Rekomb.	Anzahl Sporen
1	$\text{ana}^{\text{r}} - 8 \text{ (P1)} \times \text{ery}^{\text{r}} - 16 - 7\text{A} \text{ (P2)}$	a) 25,4 b) 34,2 c) 35,1	41,4 48,7 52,4	11,5 9,6 3,7	21,7 7,5 8,8	33,2 17,1 12,5	2646 60 52
2	$\text{ana}^{\text{r}} - 8 \text{ (P1)} \times \text{cap}^{\text{r}} - 1 - 23\text{A} \text{ (P2)}$	a) 45,8 b) 50,5 c) 48,2	47,2 45,7 42,2	0,9 1,6 0,2	6,1 2,2 9,4	7,0 3,8 9,6	3280 47 64
3	$\text{cap}^{\text{r}} - 1 - 23\text{A} \text{ (P1)} \times \text{ery}^{\text{r}} - 16 - 14\text{B} \text{ (P2)}$	a) 47,1 b) 50,0 c) 48,3	45,2 42,0 42,5	0,1 0 0	7,6 8,0 9,2	7,7 8,0 9,2	3440 53 56
4	$\text{ana}^{\text{r}} - 8\text{ery}^{\text{r}} - 16 \text{ (P1)} \times \text{ura1} - 171 \text{ (P2)}$	a) 25,6 c) 21,4	69,7 73,9	1,6 0,1	2,9 4,6	4,5 4,7	573 32
5	$\text{ana}^{\text{r}} - 8\text{cap}^{\text{r}} - 1 \text{ (P1)} \times \text{ura1} - 171 \text{ (P2)}$	a) 36,4 c) 10,2	58,8 76,2	1,6 2,5	3,2 11,1	4,8 13,6	325 32
6	$\text{cap}^{\text{r}} - 1\text{ery}^{\text{r}} - 16 \text{ (P1)} \times \text{ura1} - 171 \text{ (P2)}$	a) 2,1 c) 0	75,0 83,4	21,1 0	1,8 8,3	22,9 8,3	388 12

Tab. 47: Rekombinationshäufigkeiten in den Zygoten in %. Pro Zygoten - Kolonie wurden etwa 300 Kolonien untersucht. Ergebnisse aus den Tabellen 16 - 21. +) mit Nachbebrütung, dafür jedoch nicht identische Zygoten - Kolonien benützt.

Nr. Kreuzung	P1	P2	R1	R2	Summe Rekomb.	Anzahl Zygoten
1 ana ^r -8 (P1) x ery ^r -16-7A (P2)	A ^R E ^S 5,7	A ^S R ^R 21,0	A ^R E ^R 0,9	A ^S E ^S 72,4	73,3	32
2 ana ^r -8 (P1) x cap ^r -1-23A (A2)	+) 28,9	50,0	2,8	18,3	21,1	12
3 cap ^r -1-23A (P1) x ery ^r -16-14B (P2)	A ^R C ^S 67,4	A ^S R ^R 3,2	A ^R C ^R 0	A ^S C ^S 29,4	29,4	32
4 ana ^r -8 ery ^r -16 (P1) x mei1-102 (P2)	C ^R E ^S 2,8	C ^S E ^R 89,3	C ^R E ^R 0	C ^S E ^S 7,9	7,9	35
5 ana ^r -8 cap ^r -1 (P1) x mei1-102 (P2)	+) 0	77,9	0	22,1	22,1	9
6 cap ^r -1 ery ^r -16 (P1) x mei1-102 (P2)	A ^R E ^R 2,6	A ^S E ^S 84,8	A ^R E ^S 4,9	A ^S E ^S 7,7	12,6	23
7 cap ^r -1 ery ^r -16 (P1) x mei1-102 (P2)	A ^R C ^R 0,1	A ^S C ^S 98,4	A ^R C ^S 1,1	A ^S C ^R 0,4	1,5	61
8 cap ^r -1 ery ^r -16 (P1) x mei1-102 (P2)	C ^R E ^R 0	C ^S E ^S 97,57	C ^R E ^S 0,03	C ^S E ^R 2,4	2,43	48

1.6.3. Bestimmung der Häufigkeit doppelresistenter Rekombinanten

Nach Freisporanalyse wird die Sporensuspension auf Antibiotica - Doppelmedien plattiert, parallel dazu auf Glucose - Hefeextrakt - Medium, um den Gesamtiter (= 100 %) zu bestimmen. Nach 1 Woche Inkubation bei 30°C können die doppelresistenten Rekombinanten ausgezählt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 48 wiedergegeben. Die Daten dieser Versuche $A^R_E R = 8,3 \%$, $A^R_C R = 0,4 \%$, $C^R_E R = 0,08 \%$ stimmen etwa überein mit denen aus Freispor- und Tetradenanalysen: $A^R_E R = 11,5 \%$ und $3,7 \%$; $A^R_C R = 0,9 \%$ und $0,2 \%$; $C^R_E R = 0,1 \%$ (Tab. 46). Man kann bei dieser Methode jedoch nicht auf die reziproke Rekombinantenklasse schliessen, da die beiden Rekombinanten ungleich vorhanden sein können.

Tab. 48: Durch direktes Plattieren der Sporensuspension auf Antibiotica - Doppelmedien wird die Anzahl der doppelresistenten Rekombinanten bestimmt. Ihr Prozentsatz ist bezogen auf die gesamte Sporenmenge (= 100 %).

Kreuzung: ade7-50 h⁻ana^r-8 x ura1-171 h⁺ery^r-16-7A

$A^R_E R = 8,3$

Kreuzung: ura1-171 h⁻ana^r-8 x ade7-50 h⁺cap^r-1-23A

$A^R_C R = 1.) 0,4 \quad 2.) 0,7 \quad 3.) 0,2 \quad \text{Mittel: } 0,4$

Kreuzung: ade7-50 h⁺cap^r-1-23A x ura1-171 h⁻ery^r-16-14B

$C^R_E R = 1.) 0,095 \quad 2.) 0,07 \quad \text{Mittel: } 0,07$

1.7. Transmission

Von Dujon et al. (1974) wurde Transmission definiert als Häufigkeit, mit der die Nachkommen einer Kreuzung ein Elternallel des gleichen Locus tragen. Bei Kreuzungen von *Sacch. cerevisiae* sind von Kreuzung zu Kreuzung unterschiedliche Transmissionshäufigkeiten für das gleiche Allelpaar zu beobachten. Diese Variationen im Auftreten von Allelen (output) werden unter anderem auf ungleichen Beitrag der beiden haploiden Stämme (input) zurückgeführt. Ist die Transmissionshäufigkeit für Allele, die zu verschiedenen Loci gehören gleich, so wird dies als Kovarianz der Transmission bezeichnet. Kovarianz von untersuchten Markern bedeutet, dass diese auf demselben DNS - Molekül liegen.

In den folgenden Abschnitten sind die Transmissionshäufigkeiten für die 3 Resistenzmarker Antimycin, Chloramphenicol und Erythromycin untersucht, sowohl in haploiden Zellen aus Sporen - Klonen als auch in diploiden Zellen aus Zygoten - Klonen.

1.7.1. Transmission der Resistenzmarker in haploide Zellen

In Tabelle 49 ist die Transmissionshäufigkeit der Resistenzmarker in Sporen (Freisporanalyse) aufgeführt, in Tabelle 50 nach etwa 20 Generationen Nachbebrütung der Sporen. Da schon etwa 82 % der Sporen reinerbig sind, ändern sich die Werte durch die Nachbebrütung nicht wesentlich (vergleiche Tab. 49 und Tab. 50).

Es zeigt sich Kovarianz der Transmission der 3 Resistenzmarker. Die Transmissionsrate der resistenten Allele ist geringer als die der sensiblen. Sie liegt bei ersteren meistens unter 50 % bei den Kreuzungen in trans - Konfiguration mit je 1 Resistenzallel (siehe dazu umrahmte Zahlen in den Tabellen 49 und 50, Kreuzungen Nr. 1-5).

Bei den Kreuzungen in cis - Konfiguration mit 2 oder 3 Resistenzen in einem Kreuzungspartner zeigen sich zwar grosse

Abweichungen vom 50 % - Wert, trotzdem aber Kovarianz der Transmission für den Antimycin-, Chloramphenicol- und Erythromycin - Resistenzmarker. Die Transmissionsrate des sensiblen Stammes beträgt 74 % - 96 %, die der doppel- und dreifachresistenten Stämme 3 % - 26 % (Tab. 49 und 50, Kreuzungen Nr. 6-9). Die Werte der Kreuzung Nr. 8 passen nicht in dieses Schema, was eventuell auf die geringe Stichprobengrösse dieser Kreuzung zurückzuführen ist.

Für die beiden 3 - Faktor - Kreuzungen Nr. 4 und Nr. 5, Tabelle 49 und 50, ergeben sich Transmissionshäufigkeiten für den Kreuzungspartner mit 1 Resistenzallel von etwa 50 %, wie schon bei den Kreuzungen in trans - Konfiguration mit je 1 Resistenzallel festgestellt (Tab. 49 und 50, Kreuzungen 1-3). Für die doppelresistenten Kreuzungspartner (Kreuzungen Nr. 4 und 5) erhält man für die Resistenzmarker eine Transmission von etwa 30 %, wie für die Kreuzungen in cis - Konfiguration schon beobachtet (Tab. 49 und 50, Kreuzungen Nr. 6-9).

1.7.2. Transmission der Resistenzmarker in Zygoten

Die Transmissionsrate der Resistenzmarker in die Zygoten ist allgemein viel niedriger als in den Sporen. Doppelresistente Stämme zeigen eine noch geringere Transmissionsrate im Vergleich zu den entsprechenden Werten der Sporen. Die Transmission ist nicht kovariant. Die Transmissionsrate des Chloramphenicol - Resistenzalleles ist sehr gering. In den Kreuzungen in cis - Konfiguration (Tab. 51, Kreuzungen Nr. 4-7) ist die Transmissionsrate niedriger als die der Antimycin- und der Erythromycinmarker. Dieser Unterschied zeigt sich verstärkt in den Kreuzungen in trans - Konfiguration (Tab. 51, Kreuzung Nr. 2 und 3), da durch die niedrige Transmissionsrate des Chloramphenicol - Resistenzalleles die Antimycin - und Erythromycin - Resistenzallele sehr hohe Transmissionshäufigkeiten (67,4 % bzw. 89,3 %) annehmen.

Tab. 49: Transmission der Marker in haploide Zellen nach Sporenbildung (Freisporanalyse).
Werte aus den Tabellen 41, 42 und 44. Zahlen in %, Umrahmte Zahl = Resistenzallel.

Kreuz. Nr.	$h^- \times h^+$	C^h	A^h	E^h	C^{h^-}	A^{h^-}	E^{h^-}	Anzahl Kolonien
1	$ana^r - 8 \times ery^r - 16-7A$	--	63,1	<u>52,9</u>	---	<u>36,9</u>	47,1	2646
2	$ana^r - 8 \times cap^r - 1-23A$	<u>48,1</u>	53,3	---	51,9	<u>46,7</u>	---	3280
3	$ery^r - 16 \times 14B \times cap^r - 1-23A$	<u>47,2</u>	---	54,7	52,8	---	<u>45,3</u>	3440
4	$ana^r - 8 \times ery^r - 16 \times cap^r - 1$	<u>47,3</u>	58,0	65,1	52,7	<u>42,0</u>	<u>34,9</u>	877
5	$ana^r - 8 \times cap^r - 1 \times ery^r - 16-7A$	73,3	72,5	<u>45,8</u>	<u>26,7</u>	<u>27,5</u>	54,2	943
6	$ana^r - 8 \times ery^r - 16 \times ural-171$	---	72,6	71,6	---	<u>27,5</u>	<u>28,4</u>	573
7	$ana^r - 8 \times cap^r - 1 \times ural-171$	60,4	62,0	---	<u>39,6</u>	<u>38,0</u>	---	313
8	$cap^r - 1 \times ery^r - 16 \times ural-171$	76,8	---	96,1	<u>23,2</u>	---	<u>3,9</u>	388
9	$ana^r - 8 \times cap^r - 9 \times ery^r - 16 \times ural-171$	82,3	70,1	62,2	<u>17,7</u>	<u>29,9</u>	<u>37,8</u>	785

Tab. 50: Transmission der Resistenzmarker in haploide Sporen (Tetradenanalysen) und erneute Plattierung der Sporen - Kolonien (20 Generationen Zwischenbebrütung). Pro Sporen Kolonien wurden etwa 100 Kolonien ausgewertet. Die Werte sind aus den Tabellen 27 - 35. Zahlen in %.

Kreuz. Nr.	$h^- \times h^+$	C^h	A^h	E^h	C^h	λ	E^h	Anzahl Tetraden
1	$r^- - 8 \times ery^r - 16-7A$	---	61,2	<u>56,1</u>	---	<u>38,8</u>	43,9	13
2	$r^- - 8 \times cap^r - 1-23A$	<u>42,4</u>	51,6	----	57,6	<u>48,4</u>	----	16
3	$ery^r - 16-14B \times cap^r - 1-23A$	<u>42,5</u>	----	51,7	57,5	----	<u>48,3</u>	14
4	$ana^r - 8 ery^r - 16 \times cap^r - 1$	<u>56,0</u>	70,5	67,3	44,0	<u>29,5</u>	<u>32,7</u>	8
5	$ana^r - 8 cap^r - 1 \times ery^r - 16-7A$	73,8	76,6	<u>30,7</u>	<u>26,2</u>	<u>23,4</u>	69,3	9
6	$ana^r - 8 ery^r - 16 \times ural-171$	----	78,5	74,0	----	<u>21,5</u>	<u>26,0</u>	8
7	$r^- - 8 cap^r - 1 \times ural-171$	78,7	87,3	----	<u>21,3</u>	<u>12,7</u>	----	8
8	$cap^r - 1 ery^r - 16 \times ural-171$	100	----	91,7	0	----	<u>8,3</u>	3
9	$ana^r - 8 cap^r - 9 ery^r - 16 \times ural-171$	96,6	78,5	74,6	<u>3,4</u>	<u>21,5</u>	<u>25,4</u>	15

Tab. 51: Transmission der Resistenzmarker in Zygoten. Die Werte sind aus den Tabellen 16 - 22, Zahlen in %. Umrahmte Zahl = Resistenzallel.

Kreuz. Nr.	$h^- \times meil$	C^{meil}	A^{meil}	E^{meil}	C^{h^-}	A^{h^-}	E^{h^-}	Zyg. Kol.
1	$ana^r-8 \times ery^r-16-12B$	---	93, 4	<u>21, 9</u>	---	<u>6, 6</u>	78, 1	32
2	$ana^r-8 \times cap^r-1-3C$	<u>3, 2</u>	32, 6	---	96, 8	<u>67, 4</u>	---	32
3	$ery^r-16-14B \times cap^r-1-2C$	<u>2, 8</u>	---	10, 7	97, 2	---	<u>89, 3</u>	35
4	$ana^r-8 \times ery^r-16 \times meil-102$	---	92, 5	89, 7	---	<u>7, 5</u>	<u>10, 3</u>	23
5	$ana^r-8 \times cap^r-1 \times meil-102$	99, 5	98, 8	---	<u>0, 5</u>	<u>1, 2</u>	---	61
6	$cap^r-1 \times ery^r-16 \times meil-102$	99, 97	---	97, 6	<u>0, 03</u>	---	<u>2, 4</u>	48
7	$ana^r-8 \times cap^r-9 \times ery^r-16 \times meil-102$	99, 9	95, 3	94, 3	<u>0, 1</u>	<u>4, 7</u>	<u>5, 7</u>	24

1.8. Prüfung des Einflusses des Chloramphenicol -Resistenz-
markers auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Stämme
cap^r-1 ery^r-16 und cap^r-1 ana^r-8.

Wie aus der Tabelle 47, Kreuzung Nr. 2, 3, 5 und 6 ersichtlich ist, sind Zellen doppelresistenter Typen, welche das Chloramphenicol - Resistenzallel tragen, stark benachteiligt. Um zu prüfen, ob dies auf einem Wachstumsnachteil beruht, wurde folgendes Experiment durchgeführt. Zellen der Stämme cap^r-1 ery^r-16 bzw. cap^r-1 ana^r-8 werden mit Zellen des sensiblen Kreuzungspartners ura1-171 gemischt, verdünnt und auf supplementiertes Vollmedium plattiert. Ein Teil der Platten wird auf Selektivmedien gestempelt, um das Ausgangsmischungsverhältnis zu bestimmen. Von den anderen Platten werden die Kolonien abgewaschen, verdünnt, nochmals plattiert und auf Selektivmedien gestempelt. Durch ungleichen Animpftiter ist ein ungleiches Ausgangsverhältnis bedingt, wesentlich jedoch ist, dass sich das Verhältnis während der 20 Generationen bis zur Koloniebildung nicht verändert hat.

Tab. 52: Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten der Stämme cap^r-1 ery^r-16 und cap^r-1 ana^r-8 mit dem sensiblen Stamm ura1-171 während der Koloniebildung (20 Generationen).

	cap ^r -1 ery ^r -16 + 171		ana ^r -8 cap ^r -1 + 171	
%	32	68	38	62
Kolonien:	207	448	235	379
nach Koloniebildung (20 Generationen):				
%	38	62	33	77
Kolonien:	283	457	254	520

2. Chromosomale Vererbung der Erythromycin - Resistenz

2.1. Bestimmung der Vermehrungsrate

Mit Hilfe photometrischer Messungen (Klett - Photometer) wurde die Vermehrung des Wildtyps mei3-71 und der aus diesem Stamm abgeleiteten Mutanten ery^R n-38, -42, -62 und -63 verfolgt. In Tabelle 53 ist die Generationsdauer des Wildtyps und einer der Mutanten aufgeführt. Die Generationsdauer ist wie im Kapitel 1.2. angegeben definiert und berechnet. Obwohl vergärbares Substrat vorhanden ist, wächst der Wildtyp mit einer Generationsdauer von 20 Stunden in Glucose mit Erythromycin viel langsamer als in Glucose allein mit einer Generationsdauer von 5 Stunden.

Tab. 53: Generationsdauer in Stunden

	mei3-71	ery^R n-62
Glucose	5	5
Glycerin	5	7
Glucose + Erythromycin	20	7
Glycerin + Erythromycin	kein Wachstum	15

2.2. Fehlen der mitotischen Segregation

Da bei Schiz. pombe die Diploiden nicht stabil sind, wurde ihre Untersuchung erst mit Hilfe der von Egel (1973) isolierten sporulationsdefekten Mutanten möglich. Die Mutation zur Sporulationsdefizienz wird bei den Mutanten mei3-71-216 h^+ und mei3-71-210 h^- ery^R rezessiv vererbt. Wird eine dieser Mutanten mit einem sporulationskompetenten Stamm entgegengesetzten Paarungstyps gekreuzt, so entstehen Ascosporen. Kreuzt man

zwei sporulationsdefekte Stämme entgegengesetzten Paarungstyps, so erhält man stabile Diploide. Für die 4 Erythromycin - resistenten Mutanten wurde folgende Kreuzung durchgeführt:

$\text{mei3-71 ade6-210 h}^- \text{ery}^r \times \text{mei3-71 ade6-216 h}^+$.

Die entstehenden Diploiden sind bei allen 4 Mutanten sensibel, die Erythromycin - Resistenz wird demnach rezessiv vererbt. Das Fehlen der mitotischen Segregation ist ein Beweis chromosomaler Vererbung.

2.3. Tetradenanalysen

Nach Kreuzung der 4 Mutanten $\text{mei3-71ade6-210 h}^- \text{ery}^r \times \text{ura1-171 h}^-$ wurden Tetradenanalysen ausgeführt. Bei insgesamt 88 vollständigen Tetraden ergab sich ohne Ausnahme eine Aufspaltung von resistenten zu sensiblen Sporen von 2R : 2S. Als Kontrolle dienten der Paarungstyp und die beiden Auxotrophien, die auch immer 2 : 2 aufspalteten. Es konnte gezeigt werden, dass aus jeder Spore reinerbige Klone hervorgehen. Ausserdem ergaben sich nach Kreuzung zwischen 2 sensiblen bzw. 2 resistenten Sporen nur sensible bzw. nur resistente Nachkommen sowohl in Freispor- als auch in Tetradenanalysen.

2.4. Freisporanalysen

Die Ergebnisse der Freisporanalysen, die die Untersuchung einer grösseren Anzahl von Nachkommen erlaubt, stimmen mit den Ergebnissen der Tetradenanalysen überein (Tab. 54). Es ergibt sich eine für Kernkodierung charakteristische Aufspaltung der auxotrophen Marker und der Erythromycin - Resistenz von annähernd 50 % : 50 %.

Tab. 54: Freisporanalysen der folgenden Kreuzung: $\text{mei}^3\text{-71 ade6-210 h}^-\text{ery n x ura1-171 h}^+$
Zahlen in %.

Kreuzung	E^S ade ura	E^S ADE ura	E^S ade URA	E^S ADE URA	E^R ade ura	E^R ADE ura	E^R ade URA	E^R ADE URA	Kolo- nien
ery^r n-38 x 171	7,6	17,1	8,0	8,6	8,8	9,3	28,5	12,1	1015
ery^r n-42 x 171	7,8	13,9	11,7	10,3	7,6	9,0	27,7	12,0	1175
ery^r n-62 x 171	11,6	17,2	9,1	11,1	8,9	8,8	18,3	15,0	1158
ery^r n-63 x 171	8,2	11,5	12,5	12,4	10,0	9,1	20,0	16,3	898

Zusammenfassung:

Kreuzung	E^S	F^R	ade ura	ADE ura	ade URA	ADE URA
ery^r n-38 x 171	41,3	58,7	16,4	26,4	36,5	20,7
ery^r n-42 x 171	43,7	56,3	15,4	22,9	39,4	22,3
ery^r n-62 x 171	49,0	51,0	20,5	26,0	27,4	26,1
ery^r n-63 x 171	44,6	55,4	18,2	20,6	32,5	28,7

2.5. Mitotische Haploidisierung

Die Haploidisierung der sensiblen Diploiden ergab für alle 4 Mutanten, dass die Erythromycin - Resistenz gekoppelt an den ade 6 - Marker vererbt wird (Tab. 55). Sie ist somit auf dem III. Chromosom zu lokalisieren.

Von J. Kohli in Bern (1976 und 1977) wurden die Erythromycin - Resistenzen genauer kartiert. Ery 1 ist

25 Karteneinheiten vom Centromer entfernt. Die Entfernung gekoppelter Loci in Karteneinheiten lässt sich mit Hilfe folgender Formel errechnen:
$$\frac{50 \cdot (T + 6 \text{ NPD})}{PD + NPD + T}$$
 (Perkins, 1949). T = Anzahl Tetratypen, PD = Anzahl Parentalditypen, NPD = Anzahl Rekombinantenditypen (non-parental ditype).

Tab. 55: Haploidisierung der sensiblen Diploiden von folgender Kreuzung:

mei3-71 ade6-210 h⁺ ery^r n x mei1-102 ural-171 his3-237. Zahlen in %.

ura 1 - Chromosom I, his 3 - Chromosom II, ade 6 - Chromosom III.

Marker	ery ^r n-38 x 102 E ^S E ^R	ery ^r n-42 x 102 E ^S E ^R	ery ^r n-62 x 102 E ^S E ^R	ery ^r n-63 x 102 E ^S E ^R
ADE URA HIS	14,1 0	16,6 0,1	18,2 1,0	8,3 0,1
ADE URA his	12,7 0	14,9 0,1	17,0 0	9,6 0,2
ADE ura HIS	11,9 0,2	12,1 0,1	17,0 0,9	10,1 0,2
ADE ura his	20,2 0,2	21,2 0	20,5 0	13,9 0,1
ade URA HIS	0 6,4	0 5,0	0 2,7	0 5,1
ade URA his	0 9,9	0 10,1	0 7,1	0 12,4
ade ura HIS	0,2 6,7	0,1 7,6	0 3,7	0,3 9,3
ade ura his	0,2 17,3	0,6 11,5	0 11,9	0,5 29,9
Summe %	59,3 40,7	65,5 34,5	72,7 27,3	42,7 57,3
Kolonien	369 254	577 304	488 184	791 1055

IV. DISKUSSION

Durch den Mutatoreffekt der Mutante ana^r-8 konnten 200 Erythromycin - und 89 Chloramphenicol - resistente Mutanten isoliert werden. Diese erwiesen sich durch die Kriterien der mitotischen Segregation, durch das häufige Auftreten aberranter Tetraden und durch die Uniformität der Haploiden nach mitotischer Haploidisierung als extrachromosomal, höchstwahrscheinlich mitochondrial vererbt. Damit war die Möglichkeit gegeben, Segregationsvorgänge, Transmission und Rekombination extrachromosomaler Marker bei *Schiz. pombe* zu untersuchen.

1. Segregation

1.1. Geschwindigkeit der Segregation

Nach Kreuzung zweier haploider Zellen mit verschiedenen mitochondrialen Genotypen entstehen diploide heteroplasmatische Zygoten, die mitochondriale DNS - Moleküle beider Eltern enthalten. Bei *Sacch. cerevisiae* bilden diese mtDNS - Moleküle in der Zygote und in ihren heteroplasmatischen Knospen einen "Pool", in dem mehrere Paarungen und Rekombinationen der mtDNS - Moleküle stattfinden und dabei neue mitochondriale Genotypen entstehen können. Die sich daraus ergebende Situation ist analog der in einer phagen - infizierten Zelle (Thomas und Wilkie, 1968; Wolf et al., 1973; Dujon et al., 1974). Bei der anschliessenden vegetativen Vermehrung werden die mtDNS - Moleküle auf Mutterzelle und Knospe aufgeteilt. Die ersten Knospen können heteroplasmatisch oder homoplasmatisch sein. Die Entstehung homoplasmatischer Zellen ist sogar schon nach 1 Generation möglich. Wie durch Populationsanalysen von Zygoten - Klonen (Coen et al., 1970; Callen, 1974 a; Uchida und Suda, 1976) und Stammbaumanalysen von Knospen einzelner Zygoten gezeigt wurde (Lukins et al., 1973; Waxman et al.,

1973; Wilkie und Thomas, 1973; Callen, 1974 b; Dujon et al., 1974; Forster und Kleese, 1975), sind nach 5 - 10 Generationen alle Zellen homoplasmatisch. Die Aufspaltung der Tetraden nach etwa 20 Generationen in 4R : 0S bzw. 0R : 4S ist ein weiterer Beweis für die schnelle Segregation mitochondrialer Marker bei *Sacch. cerevisiae*. Auf Grund dieser Ergebnisse ist zu vermuten, dass die Sporen von *Sacch. cerevisiae* reinerbig sind, jedoch liegen keine publizierten Ergebnisse über Sporen - Analysen vor.

Untersuchungen der Segregationsvorgänge extrachromosomaler Marker bei *Schiz. pombe* dagegen zeigen dazu wesentliche Unterschiede. Einerseits sind sehr langsame Segregationsvorgänge zu beobachten; 20 Generationen nach Zygotenbildung sind 40 % der Zygoten (bzw. nach Sporenbildung 18 % der Sporen) und nach etwa 50 Generationen immer noch 14 % der Zygoten (bzw. 6 % der Sporen) heteroplasmatisch. Andererseits findet in einigen Zygoten eine schnelle Segregation statt, die zu uniparentalen bzw. unirekombinanten (nur des doppelsensiblen Typs) Zygoten führt.

Die unterschiedliche Geschwindigkeit der Segregationsvorgänge im mitotischen und meiotischen System kann folgende Gründe haben:

- 1.) Da die Zeitspanne, die für Cytoplasmadurchmischung, Paarung und genetischen Austausch zur Verfügung steht in den Zygoten nahezu unbegrenzt ist, in den Sporen aber durch Sporenmembranbildung beendet wird, sind mehr Sporen - Kolonien als Zygoten - Kolonien homoplasmatisch.
- 2.) Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Yoo et al. (1973) haben gezeigt, dass viele Mitochondrien bei der Sporenbildung ausserhalb der Sporen im Cytoplasma bleiben und damit vom Rekombinationsgeschehen ausgeschlossen werden. Sie werden dort vermutlich zum Aufbau der Zellmembran oder lytischer Enzyme für die Ascuswand gebraucht. Dadurch wird die Anzahl mtDNS - Moleküle geringer und die Wahrscheinlichkeit einer schnelleren Ent-

mischung grösser.

1.2. Segregationsmuster individueller Zygoten - Klone

Die Verteilung von parentalen und rekombinanten Genotypen auf die ersten Nachkommen von Zygoten wurde von Lukins et al. (1973) untersucht. Er fand in Übereinstimmung mit Linnane et al. (1968) nach individueller Zygoten - Analyse bei *Sacch. cerevisiae* eine grosse Variation in der Zusammensetzung der Zygoten-nachkommen:

- 1.) Individuelle Zygoten - Klone aus Zwei - Faktor - Kreuzungen können 1, 2, 3 oder 4 mitochondriale Genotypen enthalten.
- 2.) Die Transmissionsrate der parentalen und rekombinanten Genotypen in individuelle Zygoten - Kolonien kann von 0 - 100 % schwanken.
- 3.) Die beiden Rekombinantentypen in individuellen Klonen sind nicht gleich häufig.
- 4.) Es können reinerbige Knospen des einen oder anderen Parentaltyps entstehen (uniparentale Vererbung).

Diese Punkte treffen auch für *Schiz. pombe* zu. Sie werden aber überlagert durch einen Sachverhalt, der von *Sacch. cerevisiae* nicht bekannt ist; das häufige Auftreten von doppelsensiblen Rekombinanten- bzw. Parentaltypen und die starke Benachteiligung der doppelresistenten Parental- bzw. Rekombinantentypen. Die drastische Begünstigung der doppelsensiblen Wildtyp - Konfiguration hat zur Folge, dass vorwiegend diese Typen uniparental vorkommen.

Uniparentale Vererbung extrachromosomaler Gene ist auch bei anderen Organismen häufig, z. B. die fast ausschliesslich mütterliche Vererbung bei *Chlamydomonas* (Sager und Lane, 1972), *Neurospora*, *Aspergillus*, *Xenopus* und *Pelargonium*. Für die uniparentale Vererbung bei *Sacch. cerevisiae* werden von Birky et al. (1976) folgende Mechanismen diskutiert:

a) Selektiver Abbau der mtDNS eines Kreuzungspartners durch Enzyme. Durch Restriktions/Modifikations - ähnliche Prozesse könnten mtDNS - Moleküle des einen oder anderen Elter eliminiert werden.

b) Selektive Replikation eines Parentaltyps.

Es wäre eine bevorzugte Besetzung von Replikationspunkten für mtDNS durch einen Elterntyp denkbar. Dass die Ungleichheit der Anzahl mtDNS - Moleküle beider Kreuzungspartner tatsächlich eine Rolle spielt, konnte gezeigt werden, indem bei Versuchen durch genetische und physiologische Veränderungen der Input variiert wurde und dann die Zahl uniparentaler Zygoten immer für den Genotyp anstieg, der dem Partner mit grösserem Input angehörte.

Bei der Mutante ana^r-8 könnten folgende Ursachen zu uniparentalen Zygoten führen:

- eventuell besitzt diese Mutante weniger mtDNS - Moleküle pro Zelle,
- die mtDNS von ana^r-8 repliziert langsamer,
- die Fragilität der Mitochondrien bzw. der mtDNS ist grösser.

2. Transmission

Bei den Sporen zeigt sich Kovarianz der Transmission für alle 3 beschriebenen Resistenzmarker. Die Transmissionsrate der Marker des h^+ - Partners beträgt etwa 65 %, die des h^- - Partners etwa 35 %. Aus der Kovarianz der 3 Resistenzmarker ist zu schliessen, dass sich alle 3 Marker auf dem gleichen Erbträger befinden. Die Transmissionsrate der Antimycin - Resistenz kann durch Ethidiumbromid verändert werden, was beweist, dass dieser Mutationsort auf der mtDNS lokalisiert ist (Wolf et al., 1976 b). Aus der Kovarianz der Transmission der Erythromycin- und Chloramphenicol - Resistenzmarker ist der Schluss zu ziehen, dass auch diese Mutationen mitochondrial vererbt werden. Bei den Zygoten ist die Transmission nicht kovariant (Tab. 51). Mögliche Erklärungen für die unterschied-

lichen Ergebnisse in Zygoten und Sporen können sein:

- 1.) Zur Analyse der Sporen wurden Stämme der Paarungstypen h^- und h^+ gekreuzt. Für die Untersuchung der Zygoten ist es notwendig, einen h^- - Stamm mit einem sporulationsdefekten Stamm (mei 1) zu kreuzen, um bei Schiz. pombe stabile Diploide zu erhalten. Ein Einfluss von Kerngenen auf die Transmissionsrate ist nicht auszuschliessen.
- 2.) Die Sporenbildung, die bei Schiz. pombe gleich nach Zygotenbildung erfolgt und dem Cytoplasma nicht viel Zeit zur Durchmischung lässt, verhindert eventuell Prozesse, die stattfinden, wenn das Cytoplasma beider Kreuzungspartner länger zusammengehalten wird. Möglicherweise verstärkt sich eine Konkurrenz zwischen mitochondrialen DNS - Molekülen der Kreuzungspartner um wenige Anheftungsstellen zur Replikation (Birky et al., 1976). Es wäre auch denkbar, dass Restriktionsenzyme in den Zygoten mehr Gelegenheit haben anzugreifen. Solche Restriktionsenzyme als Ursache unterschiedlicher Segregationsmuster in Zygoten und Sporen werden von Sager und Ramanis (1976) für Chlamydomonas angenommen.

Während das Chloramphenicol - Resistenzallel in den Sporen allein keine Verringerung der Transmissionsrate zeigt, nur in Kombination mit Antimycin- oder Erythromycin - Resistenz offensichtlich eine viel geringere Transmissionsrate bewirkt, zeigt sich in den Zygoten zusätzlich eine starke Benachteiligung auch für das Chloramphenicol - Resistenzallel allein. Dies gilt sowohl für die Transmissionshäufigkeit als auch für die Rekombination in den Zygoten.

3. Rekombination

Bei Kreuzungen in trans - Konfiguration mit je 1 Resistenzallel werden sensible bzw. resistente Allele gleich häufig transmittiert. Bei Kreuzungen in cis - Konfiguration mit dem sensiblen Kreuzungspartner ist die Transmissionshäufigkeit des Sensibilität bedingenden

Allels erhöht. In den 3 - Faktor - Kreuzungen $A^R E^R \times C^R$ und $A^R C^R \times E^R$ bedingen 2 Resistenzallele auf dem mitochondrialen Genom eine grössere Benachteiligung. Es ist dabei gleichgültig, ob es sich um einen doppelresistenten Rekombinanten- oder Parental-typen handelt. Der Effekt ist bei der Transmission der Marker in die Zygoten noch wesentlich verstärkt. Das gleiche gilt für die Rekombination in den Zygoten.

Die Benachteiligung beruht nicht auf unterschiedlichem Input, da bestimmte Rekombinantenklassen häufiger auftreten als der entsprechende Parentaltyp, z. B. bei Kreuzungen in cis - Konfiguration in den Zygoten (Tab. 51): $A^R E^R = 2,6 \%$ ist kleiner als Rekombinanten $A^R E^S = 4,9 \%$ und $A^S E^R = 7,7 \%$; $A^R C^R = 0,1 \%$ kleiner als $A^R C^S = 1,1 \%$ und $A^S C^R = 0,4 \%$; $C^R E^R = 0$ kleiner als $C^R E^S = 0,03 \%$ und $C^S E^R = 2,4 \%$. Die potenzierende Wirkung eines zweiten Markers auf die Transmissionshäufigkeit kann so durch Verlust eines Markers verringert werden.

Es stellt sich die Frage, ob die Benachteiligung der doppelresistenten Kombination auf einem Wachstumsnachteil beruht. Diese Frage kann auf Grund folgender Experimente beantwortet werden. Bei direkter Plattierung nach Freisporanalyse sind schon 82 % der Sporen reinerbig. Nach weiterer Bebrütung ändert sich die Transmission deshalb nicht wesentlich. Ein Wachstumsnachteil, der sich in diesen 7 Generationen bemerkbar machen müsste, ist demnach auszuschliessen. Ein weiteres Experiment spricht gegen einen Wachstumsnachteil. Nach der Freisporanalyse wird die Sporensuspension 1. auf selektives Medium (Antibiotica - Doppelmedien) und 2. auf nicht - selektives Medium plattiert und auf selektive Medien gestempelt. In beiden Fällen ergibt sich die gleiche Anzahl an $A^R E^R$, $A^R C^R$ und $C^R E^R$ - Kolonien. Die starke Benachteiligung des doppelresistenten Typs beruht demnach wahrscheinlich auf unterschiedlichen Eigenschaften der mtDNS - Moleküle mit 1 oder 2 Resistenzmarkern. Auch die verstärkte Benachteiligung der doppelresistenten Kombination zusammen mit dem Chloramphenicol - Resistenzmarker beruht

nicht auf unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeit, wie der Versuch 1.8. durch Vergleich mit einem sensiblen Stamm zeigt.

Beispiele aus der Literatur für Benachteiligung bestimmter Kombinationen mitochondrialer Marker in einer Zelle wurden bei *Kluyveromyces* und *Paramecium* beobachtet. Bei *Kluyveromyces* sind in einer Kreuzung zwischen Oligomycin- und Chloramphenicol - resistenten Stämmen die doppelresistenten Rekombinanten $O^R C^R$ sehr selten (Brunner et al., 1977). Die Autoren nehmen als Ursache für die Polarität einen omega - ähnlichen Faktor an, wie er auch für *Sacch. cerevisiae* bekannt ist (Avner et al., 1973). Diese Erklärungs-möglichkeit ist für *Schiz. pombe* unwahrscheinlich, da hier über-wiegend der doppelsensible Genotyp auftritt, gleichgültig, ob als Parental- oder Rekombinantentyp. Bei *Paramecium* war es nicht möglich, $E^R C^R$ - Rekombinanten zu isolieren (Adoutte, 1974). Der Autor nimmt an, dass die Ribosomen in den $E^R C^R$ - Mutanten die Fähigkeit zur Proteinsynthese verloren haben. Solche Ergebnisse könnten durch letale Wirkung einer bestimmten Kombination zweier Marker erklärt werden.

Die für *Schiz. pombe* bisher erhaltenen Rekombinations-daten führen nicht zu einer eindeutigen Kartierung. Einige Besonder-heiten der Mutante ana^r-8 erschweren die Rekombinationsanalysen:

- 1.) Es entstehen viele homoplasmatisch sensible Zygoten bzw. Sporen sowohl im Parental- als auch im Rekombinantentyp.
- 2.) Doppelresistente Rekombinanten oder Parentaltypen sind stark benachteiligt. Diese Umstände führen zu den Unterschieden bei cis- und trans - Kreuzungen.
- 3.) Neben dem unter 1.) erwähnten schnell verlaufenden Prozess, der zu reinerbigen Zellen führt, läuft ein langsamer Segregations-prozess ab, der in vielen Fällen nach mehr als 50 Generationen noch nicht beendet ist. Deshalb sind viele der diploiden Kolonien noch mischerbig und lassen sich phänotypisch nicht zweifelsfrei zuordnen.

Rekombinationsanalysen bei *Sacch. cerevisiae* haben gezeigt, dass

zwischen bestimmten Markern die maximale Rekombinationshäufigkeit von 25 % erreicht wird. Auf Grund dieses Ergebnisses lässt sich nichts über ihre Lokalisierung auf dem Genom aussagen. Für drei extrachromosomale Marker werden bei *Aspergillus* (Rowland und Turner, 1974 und 1975) gleiche Rekombinationshäufigkeiten in der Grössenordnung, wie von *Sacch. cerevisiae* bekannt ist, gefunden. Die Autoren nehmen an, dass es sich bei dem Fehlen genetischer Kopplung im Rekombinationsexperiment um ein Charakteristikum extrachromosomaler Marker handelt. Die Rekombinationshäufigkeiten für *Schiz. pombe* liegen jedoch bei den meisten Kreuzungen in der Grössenordnung von 5 % - 10 %. In einigen Kreuzungen wurden Rekombinationshäufigkeiten bis zu 30 % gefunden, ein Wert der sehr wahrscheinlich auf das Überwiegen der doppelsensiblen Rekombinanten zurückzuführen ist. Zwischen Antimycin und Paromomycin wurde eine Rekombinationshäufigkeit von etwa 15 % gefunden (Del Giudice et al., 1977). Somit liegen die Rekombinationshäufigkeiten bei *Schiz. pombe* niedriger als bei *Sacch. cerevisiae*. Möglicherweise wird dies durch das Fehlen der AT - reichen Sequenzen bei *Schiz. pombe* hervorgerufen, die von Dujon et al. (1974, 1975) für Besonderheiten mitochondrialer Rekombination bei *Sacch. cerevisiae* verantwortlich gemacht werden. Der höchste Grad der Kopplung beträgt 25 % bei *Sacch. cerevisiae*. Dieser Kopplungsgrad wird bereits von Markern gezeigt, welche ungefähr 1/10 der Gesamtlänge des mitochondrialen DNS - Moleküls voneinander entfernt liegen. Die Kartierung des mitochondrialen Genoms durch Rekombinationsanalyse stösst bei diesem Objekt auf Schwierigkeiten, solange nicht eine grosse Anzahl gleichmässig über das ganze mitochondriale Genom verteilte Marker zur Verfügung stehen. Aus dem Gesagten geht hervor, dass *Schiz. pombe* eine wesentlich geringere Rekombinationshäufigkeit der mitochondrialen DNS aufweist. Relativ weit entfernte Marker müssten noch deutliche Kopplungsbeziehungen aufweisen. Eine Kartierung der mtDNS dieses Objektes sollte daher durch Rekombinationsanalyse möglich, auf jeden Fall einfacher durchführbar sein als dies für *Sacch. cerevisiae* gilt.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Gegensatz zum Wildtyp zeigen alle 200 Erythromycin- und alle 89 Chloramphenicol - resistente von der Mutante $\text{ana}^{\text{r}}-8$ abgeleiteten Mutanten extrachromosomalen Erbgang. Der Nachweis extrachromosomaler Vererbung erfolgte nach folgenden Kriterien:
 - a) Mitotische Segregation der Diploiden
 - b) Aufspaltung der Tetraden $2\text{R} : 2\text{S}$, $3\text{R} : 1\text{S}$, $1\text{R} : 3\text{S}$, $4\text{R} : 0\text{S}$, $0\text{R} : 4\text{S}$
 - c) Nach mitotischer Haploidisierung
 - sind die Resistenzmarker nicht an eines der 3 Chromosomen gekoppelt,
 - zeigt sich eine Uniformität der Nachkommen von resistenten bzw. sensiblen Diploiden.
- 2.- Es lassen sich sowohl im mitotischen als auch im meiotischen System 2 Arten der Segregation unterscheiden:
 - a) Ein sehr schneller Prozess findet statt, der zu uniparentalen und unirekombinanten (nur die doppelsensible Klasse) Zygoten- bzw. Sporen - Kolonien führt.
 - b) Im Gegensatz zu *Sacch. cerevisiae* bleibt in einigen Zygoten der heteroplasmatische Zustand wesentlich länger erhalten; nach 50 Generationen spalten die Zygoten- bzw. Sporen - Kolonien noch in verschiedene Genotypen auf.
 - Die Segregation läuft in den Sporen schneller ab (82 % homoplasmatischer Sporen vor, 94 % nach weiterer Bebrütung) als in den Zygoten (60 % homoplasmatischer Zygoten vor, 86 % nach weiterer Bebrütung).
 - Die Zygoten- bzw. Sporen - Kolonien lassen sich in Klassen einteilen.
 - Der Prozentsatz der Genotypen von Zygoten- bzw. Sporen - Kolonien der gleichen Klasse zeigt starke Schwankungen.

- 3.a) Die Transmission der Antimycin-, Erythromycin- und Chloramphenicol - Resistenzmarker in die Sporen ist kovariant. Man kann daraus schliessen, dass sie auf dem gleichen Genom liegen. Ein einzelnes Resistenzallel zeigt in Kreuzungen in trans - Konfiguration bereits eine Verringerung der Transmissionsrate, während 2 Resistenzallele in Kreuzungen in cis - Konfiguration eine starke Reduzierung der Transmissionsrate ergeben.
- b) Bei der Transmission der Marker in die Zygoten ist die Transmissionshäufigkeit der resistenten Allele wesentlich niedriger als die der sensiblen. Kovarianz zeigt sich weder in den Kreuzungen in cis - Konfiguration, noch in den Kreuzungen in trans - Konfiguration. Auffallend ist die stark verringerte Transmissionsrate des Chloramphenicol - Resistenzalleles.
4. Zwischen den 3 Resistenzmarkern Antimycin, Erythromycin und Chloramphenicol ist Rekombination mit einer Häufigkeit von 5 % - 10 % in den meisten Kreuzungen nachweisbar. In einigen Kreuzungen werden Rekombinationshäufigkeiten bis zu 30 % gefunden, ein Wert, der sehr wahrscheinlich auf das Überwiegen der doppelsensiblen Rekombinanten zurückzuführen ist.
5. 4 vom Wildtyp abgeleitete Erythromycin - resistente Mutanten erwiesen sich nach folgenden Kriterien als rezessiv chromosomal vererbt:
- a) Fehlen mitotischer Segregation; alle Diploiden sind sensibel.
- b) Alle Tetraden spalten 2R : 2S.
- c) Nach mitotischer Haploidisierung segregiert die Resistenz stets an den auxotrophen Marker *ade 6* gekoppelt, d.h. der die Erythromycin - Resistenz bedingende Mutationsort ist auf dem III. Chromosom lokalisiert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Adoutte, A.

Mitochondrial mutations in *Paramecium*: phenotypical characterization and recombination.

In: Biogenesis of Mitochondria

Academic Press, New York. 263-271 (1974)

Edts. Kroon; Saccone

Aufderheide, K. J.; Johnson, R. G.

Cytoplasmic inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of zygotic mitochondrial inheritance patterns.

Molec. gen. Genet. 144, 289-299 (1976)

Avner, P. R.; Coen, D.; Dujon, B.; Slonimski, P. P.

Mitochondrial genetics. IV. Allelism and mapping studies of oligomycin resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.

Molec. gen. Genet. 125, 9-25 (1973)

Bandlow, W.; Kaudewitz, F.

Action of ethidium bromide on mitochondrial DNA in the petite - negative yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

Molec. gen. Genet. 131, 333-338 (1974)

Birky, C. W., jr.; Colson, A. M.; Perlman, P. S. et al.

A proposal for a uniform nomenclature in mitochondrial and chloroplast genetics.

Molec. gen. Genet., in Vorbereitung

Birky, C. W., jr.; Demko, C. A.; Perlman, P. S.; Strausberg, R.

Uniparental inheritance of mitochondrial genes in yeast: generality of the phenomenon, dependence on input bias of mitochondrial DNA, and preliminary investigations of the mechanism.

Genetics, im Druck

Bolotin, M.; Coen, D.; Deutsch, J.; Dujon, B.; Netter, P.; Petrochilo, E.; Slonimski, P. P.

La recombinaison des mitochondries chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Bull. Inst. Pasteur 69, 215-239 (1971)

Borst, P.; Kroon, A. M.

Mitochondrial DNA: physicochemical properties, replication and genetic function.

Int. Rev. Cytol. 26, 107-190 (1969)

Brunner, A.; de Cobos, A. T.; Griffiths, D. E.

The isolation and genetic characterization of extrachromosomal chloramphenicol and oligomycin - resistant mutants from the petite - negative yeast *Kluyveromyces lactis*.

Molec. gen. Genet. 152, 183-191 (1977)

Bulder, C. J. E. A.

Induction of petite mutation and inhibition of synthesis of respiratory enzymes in various yeasts.

Antonie van Leeuwenhoek 30, 1-9 (1964)

Burger, G.

Mechanismus der Antimycin - Resistenz der Mutante Ant 8 von *Schizosaccharomyces pombe*, sowie Funktion zweier spezifischer Bindungsstellen für Antimycin im Elektronentransport der Atmungskette des Wildtyps des gleichen Organismus.

Dissertation, München, 1976

Callen, D. F.

Recombination and segregation of mitochondrial genes in *Saccharomyces cerevisiae*.

Molec. gen. Genet. 134, 49-63 (1974 a)

Callen, D. F.

Segregation of mitochondrially inherited antibiotic resistance genes in zygote cell lineages of *Saccharomyces cerevisiae*.

Molec. gen. Genet. 134, 65-76 (1974 b)

Clark-Walker, G. D.; Miklos, G. L. G.

Mitochondrial genetics, circular DNA and the mechanism of the petite mutation in yeast.

Genet. Res., Cam. 24, 43-57 (1974)

Coen, D.; Deutsch, J.; Netter, P.; Petrochilo, E.; Slonimski, P. P.

Mitochondrial genetics. I. Methodology and phenomenology.

Symp. soc. experimen. biol. XXIV, Cambridge, University Press, 1970

Da Cunha, M. F.

Mitotic mapping of *Schizosaccharomyces pombe*.

Genet. Res., Cam. 16, 127-144 (1970)

Del Giudice, L.; Wolf, K.; Seitz, G.; Burger, G.; Lang, B.;
Kaudewitz, F.

Extrachromosomal inheritance in *Schizosaccharomyces pombe*. III. Isolation and characterization of paromomycin-resistant mutants.

Molec. gen. Genet. 152, 319-324 (1977)

Dujon, B.; Slonimski, P. P.; Weill, L.

Mitochondrial genetics. IX. A model for recombination and segregation of mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*.

Genetics 78, 415-437 (1974)

Dujon, B.; Kruszevska, A.; Slonimski, P. P.; Bolotin-Fukuhara, M.;
Coen, D.; Deutsch, J.; Netter, P.; Weill, L.

Mitochondrial genetics. X. Effects of UV irradiation on transmission and recombination of mitochondrial genes in *Saccharomyces cerevisiae*.

Molec. gen. Genet. 137, 29-72 (1975)

Egel, R.

Physiological aspects of conjugation in fission yeast.

Planta 98, 89-96 (1971)

Egel, R.

Commitment to meiosis in fission yeast.

Molec. gen. Genet. 121, 277-284 (1973)

Forster, J. L.; Kleese, R. A.

The segregation of mitochondrial genes in yeast. II. Analysis of zygote pedigrees of drug-resistant $\times$ drug-sensitive crosses.

Molec. gen. Genet. 139, 341-355 (1975)

Gutz, H.; Heslot, H.; Leupold, U.; Loprieno, N.

Schizosaccharomyces pombe.

Handbook of Genetics, Vol. 1. Edited by R. C. King,
Plenum Press, 395-446 (1974)

Heslot, H.; Louis, C.; Goffeau, A.

Segregational respiratory-deficient mutants of a "petite - negative" yeast *Schizosaccharomyces pombe*. 972 h⁻.

J. Bacteriol. 104, 482-491 (1970)

Hollenberg, C. P.; Borst, P.; van Bruggen, E. F. J.

Mitochondrial DNA. V. A 25 μ closed circular duplex DNA molecule in wild - type yeast mitochondria. Structure and genetic complexity.

Biochim. Biophys. Acta 209, 1-15 (1970)

Johnson, B. F.

Growth of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* with late excentric, lytic fission in an unbalanced medium.

J. Bacteriol. 94, 192-195 (1967)

Kohli, J.

Chromosomenkartierung bei *Schizosaccharomyces pombe*.

Dissertation, Bern 1976

Kohli, J.; Hottinger, H.; Munz, P.; Strauss, A.; Thuriaux, P.

Genetic mapping in *Schizosaccharomyces pombe* by mitotic and meiotic analysis and induced haploidization.

Genetics, im Druck (1977)

Lang, B.; Burger, G.; Wolf, K.; Bandlow, W.; Kaudewitz, F.

Studies on the mechanism of electron transport in the bc₁ - segment of the respiratory chain in yeast.

III. Isolation and characterization of an antimycin resistant mutant ANT 8 in *Schizosaccharomyces pombe*.

Molec. gen Genet. 137, 353-363 (1975)

Leupold, U.

Methodisches zur Genetik von *Schizosaccharomyces pombe*.

Schweizerische Zeitschrift allgemeine Pathologie

Bakteriologie 18, 1141-1146 (1955)

Leupold, U.

Genetical methods for *Schizosaccharomyces pombe*.

In: Methods in Cell Physiology, Vol 4, D.M. Prescott, ed., New York, Academic Press, 169-177 (1970)

- Linnane, A. W. ; Saunders, G. W. ; Gingold, E. B. ; Lukins, H. B.
The biogenesis of mitochondria. V. Cytoplasmic inheritance of erythromycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 59, 903-910 (1968)
- Lukins, H. B. ; Tate, W. R. ; Saunders, G. W. ; Linnane, A. W.
The biogenesis of mitochondria. 26. Mitochondrial recombination: the segregation of parental and recombinant mitochondrial genotype during vegetative division in yeast.
Molec. gen. Genet. 120, 17-25 (1973)
- Mahler, H. R. ; Bastos, R. N.
A novel reaction of mitochondrial DNA with ethidium bromide.
FEBS Letters 39, 27-34 (1974)
- Mattenheimer, H.
Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemisch Laboratorium.
2. Auflage, Walter de Gruyter und Co, Berlin, 1966
- Munz, P. ; Leupold, U.
Characterization of ICR - 170 - induced mutations in *Schizosaccharomyces pombe*.
Mutat. Res. 9, 199-212 (1970)
- O'Connor, R. M. ; Mc Arthur, C. R. ; Clark-Walker, G. D.
Closed - circular DNA from mitochondrial - enriched fractions of four petite - negative yeasts.
Europ. J. Biochem. 53, 137-144 (1975)
- O'Connor, R. M. ; Mc Arthur, C. R. ; Clark-Walker, G. D.
Respiratory-deficient mutants of *Torulopsis glabrata*, a yeast with circular mitochondrial DNA of 6 μ m.
J. Bacteriol. 126, 959-968 (1976)
- Perkins, D. D.
Biochemical mutants in the smut fungus *Ustilago maydis*.
Genetics 34, 607-626 (1949) (Appendix)

Perlman, P.S.; Mahler, H.R.

Molecular consequences of ethidium bromide mutagenesis.

Nature New. Biol. 231, 12-14 (1971)

Prunell, A.; Bernardi, G.

The mitochondrial genome of wild - type yeast cells.

IV. Genes and spacers.

J. Mol. Biol. 86, 825-841 (1974)

Rowland, R. T.; Turner, G.

Recombination between the extranuclear genes conferring oligomycin resistance and cold sensitivity in *Aspergillus nidulans*.

Molec. gen. Genet. 133, 151-161 (1974)

Rowland, R. T.; Turner, G.

Three - marker extranuclear mitochondrial crosses in *Aspergillus nidulans*.

Molec. gen. Genet. 141, 69-79 (1975)

Sager, R.; Lane, D.

Molecular basis of maternal inheritance.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2410-2413 (1972)

Sager, R.; Ramanis, Z.

Chloroplast genetics of *Chlamydomonas*

I. Allelic segregation ratios.

Genetics 83, 303-321 (1976)

Tabak, H.F.; Weijers, P.J.

The genetic complexity of *Schizosaccharomyces pombe* mitochondrial DNA.

FEBS Letters 69, Nr. 1, 211-215 (1976)

Thomas, D.Y.; Wilkie, D.

Recombination of mitochondrial drug-resistance factors in *Saccharomyces cerevisiae*.

Biochim. Biophys. Res. Commun. 30, 368-372 (1968)

Uchida, A.; Suda, K.

Pattern of somatic segregation of the cytoplasmic drug-resistance factors in yeast.

Molec. gen. Genet. 145, 159-163 (1976)

Waxman, M. F. ; Eaton, N. R. ; Wilkie, D.

Effect of antibiotics on the transmission of mitochondrial factors in *Saccharomyces cerevisiae*.

Molec. gen. Genet. 127, 277-284 (1973)

Wilkie, D. ; Thomas, D. Y.

Mitochondrial genetic analysis by zygote cell lineages in *Saccharomyces cerevisiae*.

Genetics 73, 367-377 (1973)

Wolf, K. ; Sebald-Althaus, M. ; Schweyen, R. J. ; Kaudewitz, F.

Respiratory deficient mutants of *Schizosaccharomyces pombe*.

Molec. gen. Genet. 110, 101-109 (1971)

Wolf, K. ; Dujon, B. ; Slonimski, P. P.

Mitochondrial genetics. V.: Multifactorial mitochondrial crosses involving a mutation conferring paromomycin - resistance in *Saccharomyces cerevisiae*.

Molec. gen. Genet. 125, 53-90 (1973)

Wolf, K.

Induktion, selektive Anreicherung, genetische und biochemische Charakterisierung atmungsdefekter Mutanten der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* L.

Dissertation, München 1974

Wolf, K. ; Burger, G. ; Lang, B. ; Kaudewitz, F.

Extrachromosomal inheritance in *Schizosaccharomyces pombe*. I. Evidence for an extrakaryotically inherited mutation conferring resistance to antimycin.

Molec. gen. Genet. 144, 67-73 (1976 a)

Wolf, K. ; Lang, B. ; Burger, G. ; Kaudewitz, F.

Extrachromosomal inheritance in *Schizosaccharomyces pombe*. II. Evidence for extrakaryotically inherited respiratory deficient mutants.

Molec. gen. Genet. 144, 75-81 (1976 b)

Wolf, K.; Seitz, G.; Lang, B.; Burger, G.; Kaudewitz, F.

Extrachromosomal inheritance of drug resistance and respiratory deficiency in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

In: Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria. (Bandlow, W.; Schweyen, R. j.; Thomas, D. Y.; Wolf, K.; Kaudewitz, F.; eds) Berlin: De Gruyter, 23-37 (1976 c)

Wolf, K.; Seitz, G.; Lückemann, G.; Lang, B.; Burger, G.; Bandlow, W.; Kaudewitz, F.

Extrachromosomal inheritance in a petite-negative yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

In: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria. (Th. Bücher, W. Neupert, W. Sebald, S. Werner eds.). Elsevier, North Holland, 497-501 (1976 d)

Yoo, B. Y.; Calleja, G. B.; Johnson, B. F.

Ultrastructural changes of the fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) during ascospore formation.

Arch. Mikrobiol. 91, 1-10 (1973).

L.EBENSLAUF

12. 9. 1950 geboren in Asperg, Kreis Ludwigsburg
- 1956 - 1961 Volksschule in Asperg
- 1961 - 1969 Goethe - Gymnasium in Ludwigsburg
mit Abschluss Abitur
- 1969 - 1974 Studium des Faches Biologie an der
Eberhard - Karls - Universität Tübingen
mit Abschluss Diplom
- 1974 Beginn der Doktorarbeit am Genetischen Institut
der Ludwig - Maximilians - Universität München

